

Aus dem Bereich Innere Medizin III
Klinische und Experimentelle Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar
(Prof. Dr. med. Ulrich Laufs)

**Untersuchung von Telomer-Proteinen
bei Sportlern im Vergleich zu Nicht-Sportlern**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2010

vorgelegt von
Tobias Andreas Fürster
geboren am 24.06.1984
in Saarlouis

Gewidmet meiner Familie und meinen Freunden.

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	S. 6
1.1 Summary	S. 7
2. Einleitung	S. 10
2.1 Bedeutung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen und Einfluss sportlicher Aktivität	S. 10
2.2 Telomerbiologie und Seneszenz-regulierende Proteine	S. 12
2.2.1 Der Telomerkomplex	S. 12
2.2.2 Seneszenz-regulierende Proteine	S. 14
2.3 Vorarbeiten	S. 17
2.4 Ziele der Arbeit	S. 18
3. Material und Methoden	S. 19
3.1 Material	S. 19
3.1.1 Verwendete Chemikalien und Reagenzien	S. 19
3.1.2 Antikörper und Primer	S. 21
3.1.2.1 Primärantikörper	S. 21
3.1.2.2 Sekundärantikörper	S. 21
3.1.2.3 Primer PCR	S. 21
3.1.2.4 Primer Real-Time PCR	S. 21
3.1.3 Puffer und Lösungen	S. 22
3.1.3.1 Allgemein verwendete Puffer und Stammlösungen	S. 22
3.1.3.2 Speziell verwendete Puffer und Lösungen	S. 22
3.1.4 Molekularbiologische Kits	S. 24
3.1.5 Filter und Membranen	S. 24
3.1.6 Geräte	S. 24
3.1.7 Software	S. 25
3.2 Methoden	S. 26
3.2.1 Probandenrekrutierung und Materialgewinnung	S. 26
3.2.2 Zellisolation	S. 27
3.2.3 RNA-Isolation, Reverse Transkription der Gesamt-RNA und Polymerase-Kettenreaktion	S. 28
3.2.3.1 Gesamt-RNA Isolation für PCR	S. 28

3.2.3.2	Reverse Transkription	S. 29
3.2.3.3	Polymerase-Kettenreaktion	S. 29
3.2.4	Proteinexpression und Western Blot	S. 30
3.2.4.1	Proteinbestimmung nach Lowry	S. 30
3.2.4.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	S. 31
3.2.4.3	Protein-Transfer (Blotvorgang)	S. 31
3.2.4.4	Antikörperinkubation	S. 31
3.2.5	Telomerlängenmessung mittels Flow-FISH	S. 32
3.2.5.1	Vorbereitung der Zellen	S. 32
3.2.5.2	DNA-Denaturierung	S. 32
3.2.5.3	DNA-Hybridisierung	S. 33
3.2.5.4	Waschschritte und DNA-Gegenfärbung	S. 33
3.2.5.5	Analyse am Durchflusszytometer und Auswertung	S. 33
3.2.6	Telomerlängenmessung mittels Real-Time-PCR	S. 34
3.2.6.1	Durchführung und Auswertung	S. 34
3.2.7	Telomeraseaktivitätsmessung mittels TRAP-Assay	S. 35
3.2.7.1	Proteinisolation	S. 35
3.2.7.2	Messung der Telomeraseaktivität	S. 35
3.2.8	Auswertung	S. 36
4.	Ergebnisse	S. 37
4.1	Charakteristika des Probandenkollektivs	S. 37
4.2	Hochregulation Telomer-regulierender Faktoren	S. 38
4.3	Herabregulation der Checkpoint Kinase 2 (Chk2) und vermehrte Expression der Seneszenz-Proteine p16 und p53 in Nicht-Sportlern	S. 39
4.4	Reduktion des Telomerlängenverlustes in den Mastersathleten	S. 40
4.5	Gesteigerte MNC-Telomeraseaktivität in jungen und alten Athleten	S. 42
5.	Diskussion	S. 43
5.1	Auswirkungen sportlicher Aktivität auf den Telomerkomplex und auf Seneszenz-regulierende Proteine	S. 44
5.2	Ausblick	S. 48

6. Literaturverzeichnis	S. 50
7. Danksagung und Publikation	S. 56
7.1 Danksagung	S. 56
7.2 Publikation	S. 57
8. Lebenslauf	S. 58

1. Zusammenfassung

Untersuchung von Telomer-Proteinen bei Sportlern im Vergleich zu Nicht-Sportlern

Körperliche Aktivität ist mit positiven kardiovaskulären Effekten assoziiert, deren zugrunde liegenden molekularen Mechanismen jedoch nur teilweise verstanden sind. Alter ist ein wichtiger kardiovaskulärer Risikofaktor. Zelluläre Alterung wird u.a. durch Telomere, repetitive DNA-Sequenzen am Ende der Chromosomen, und ihre assoziierten Proteine reguliert. Vorarbeiten der Arbeitsgruppe an Mäusen haben gezeigt, dass Lauftraining einen positiven Effekt auf die Telomerlänge sowie die Telomeraseaktivität hat und assoziierte Proteine reguliert. Die vorliegende Arbeit untersucht die Auswirkungen regelmäßiger sportlicher Aktivität auf den Telomerkomplex bei Menschen. Hierzu wurden junge Leistungssportler ($20,4 \pm 3,3$ Jahre) mit unsportlichen Kontroll-Personen ($21,8 \pm 2,8$ Jahre) und ältere Athleten ($51,1 \pm 7,8$ Jahre) mit Menschen ($50,9 \pm 7,6$ Jahre) ohne sportliche Aktivität verglichen.

Western Blot Analysen zeigten eine Hochregulation des Telomere Repeat-Binding Factor 2 (TRF2) in den zirkulierenden mononukleären Zellen (MNC) im Blut der Athleten. Beide Athletengruppen waren durch eine gesteigerte Aktivität der Telomerase gekennzeichnet. Die MNCs der älteren Kontrollen exprimierten verstärkt die Seneszenzproteine p16 und p53. Auf mRNA-Ebene zeigte sich in den MNCs der Athletengruppen eine Hochregulation der Telomer-stabilisierenden Faktoren TRF2, Ku70 und Ku80 und eine Herabregulation der Seneszenz-vermittelnden Cell Cycle Checkpoint-Kinase 2 (Chk2). Flow-FISH-Analysen und Real-Time PCRs zeigten erwartungsgemäß eine Verkürzung der Telomerlänge in der älteren Kontrollgruppe. Diese Alters-assozierte Verkürzung der Telomerlänge war in den MNCs der älteren Athleten nicht nachweisbar.

Diese Ergebnisse identifizieren molekulare Effekte von körperlicher Aktivität auf zelluläre Alterungsprozesse und stellen eine Grundlage für weiterführende Forschungsansätze dar.

1.1 Summary

Examination of telomere-proteins in athletes in comparison to non-athletes

Physical activity is associated with positive effects on the cardiovascular system. However, the underlying mechanisms are incompletely understood. Aging is an important cardiovascular risk factor. Cellular aging is regulated by telomeres, repetitive DNA-sequences at the end of all chromosomes, and their associated proteins. Previous work of our study group showed in a mouse model, that running has positive effects on the telomere length and the telomerase activity and regulates associated proteins. The present study examines the effects of regular physical training on the telomere complex in humans. Therefore young athletes (20,4 years \pm 3,3) were compared with corresponding control subjects (21,8 years \pm 2,8) and middle-aged athletes (51,1 years \pm 7,8) with subjects without any sportive activities (50,9 years \pm 7,6).

Western Blot analyses revealed an upregulation of the telomere repeat-binding factor 2 (TRF2) in the circulating mononuclear cells (MNCs) in the athletes blood. Both, the young and the middle-aged athletes, were characterized by an increased telomerase activity. The expression of the senescence proteins p16 and p53 was intensified in the MNCs of the older controls. In both athletes groups the mRNA of telomere-stabilizing proteins TRF2, Ku70 and Ku80 was upregulated and the mRNA of the senescence-mediating cell cycle checkpoint-kinase 2 (Chk2) was downregulated. As expected, the Flow-FISH analyses and the real-time PCRs showed a loss of telomere length in the middle-aged and untrained subjects. A corresponding shortening of telomere length was absent in the middle-aged athletes.

These results show a molecular effect of physical activity on cellular aging and may serve as a basis for further research.

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

°C	Grad Celsius
μ	mikro (10^{-6})
Abb.	Abbildung
BMI	Body Mass Index
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
CDKN2A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
cDNA	copy DNA
Chk2	Cell Cycle Checkpoint-Kinase 2
d	dezi (10^{-1})
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EPC	endotheliale Progenitorzelle
FISH	Fluoreszenz in-situ Hybridisierung
g	Gramm / Erdschwerebeschleunigung
HEK	Human Embryonic Kidney
IGF1	Insuline-like growth factor
kbp	Kilobasenpaare
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KHK	Koronare Herzkrankheit
km	Kilometer
l	Liter
m	milli (10^{-3})
M	Molar
min	Minute(n)
MNC	mononukleäre Zelle
mRNA	messenger RNA
n	Anzahl / nano (10^{-9})
NO	Stickstoffmonoxid
Nr.	Nummer
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion

RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rotations per minute – Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkriptase & Raumtemperatur
s	Sekunden
TERT	Telomerase Reverse Transkriptase
TRF1	Telomere Repeat-Binding Factor 1
TRF2	Telomere Repeat-Binding Factor 2
U	Units – Einheit der Enzymaktivität
u.a.	unter anderem
W	Watt
z.B.	zum Beispiel

2. Einleitung

2.1 Bedeutung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen und Einfluss sportlicher Aktivität

Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen in Deutschland die häufigste Todesursache dar. Im Jahre 2008 verstarben z.B. 363.785 Menschen an den Folgen einer Herz-Kreislauf-Erkrankung. Dies entspricht einem Anteil von 43% an der Gesamtmortalität. Besonders bei älteren Menschen sind Krankheiten des Herz-Kreislauf-Systems die vorherrschende Todesursache. So waren 91% der Verstorbenen über 65 Jahre alt (Statistisches Bundesamt, Pressemitteilung Nr. 344, 2009). Nicht nur in Deutschland, sondern auch in ganz Europa, in Amerika sowie in weiten Teilen Asiens sind kardiovaskuläre Erkrankungen die Haupttodesursache (Tunstall-Pedoe et al., WHO MONICA Projekt, 1994).

Das Altern ist der entscheidende Risikofaktor für die Entstehung atherosklerotischer Plaques. Daraus resultieren eine beeinträchtigte endotheliale Funktion und das Versteifen der Arterien, insbesondere auch der Aorta, was eine erhöhte linksventrikuläre Belastung, eine damit verbundene Myokardhypertrophie und letztendlich eine herabgesetzte Koronarreserve zur Folge hat. Wesentliche Komplikationen der Atherosklerose sind Myokardinfarkt, zerebrale Ischämie, sowie chronische Herz- und Niereninsuffizienz. In Menschen ohne eine voranschreitende Atherosklerose ist der Alterungsprozess der Arterien allein eine wichtige Ursache für kardiovaskuläre Ereignisse (O'Rourke et al, 2007).

Die Daten epidemiologischer Studien wie der Womens Health Initiative zeigen, dass körperliche Aktivität mit einer reduzierten kardiovaskulären Morbidität und Mortalität assoziiert ist (Manson et al., 2002). Körperliche Inaktivität hingegen ist mit einer Erhöhung der kardiovaskulären Ereignisrate verbunden (Snell et al., 1999).

Folglich ist regelmäßige sportliche Betätigung zu einem festen Bestandteil der aktuellen Leitlinien zur Prävention kardiovaskulärer Erkrankungen geworden. Körperliches Training steht in Zusammenhang mit der Verbesserung von

Beweglichkeit, Blutdruckregulation, Insulinsensitivität, abdomineller Fettreduktion, Lipidprofil sowie psychosozialen, hämodynamischen und inflammatorischen Parametern (Stewart et al., 2002). Diese Effekte beinhalten z.B. eine Steigerung der Endothelfunktion, eine Erhöhung der Anzahl und Funktion endothelialer Progenitorzellen, eine Reduktion der Atherosklerose und eine Verbesserung der Bildung von Kollateralgefäßen bei Patienten mit Diabetes mellitus, KHK und chronischer Herzinsuffizienz (Hambrecht et al., 2000). Trotz dieser Fülle an Wirkungen von Sport sind die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen bisher nur unvollständig verstanden. Aufgrund der immer älter werdenden Bevölkerung (**Abb. 1**) und der wachsenden Inzidenz an kardiovaskulären Erkrankungen, ist eine Entschlüsselung der Alterungsmechanismen und der durch Sport ausgelösten Signaltransduktionswege von wichtiger Bedeutung in Hinblick auf Präventions- und Therapiemöglichkeiten.

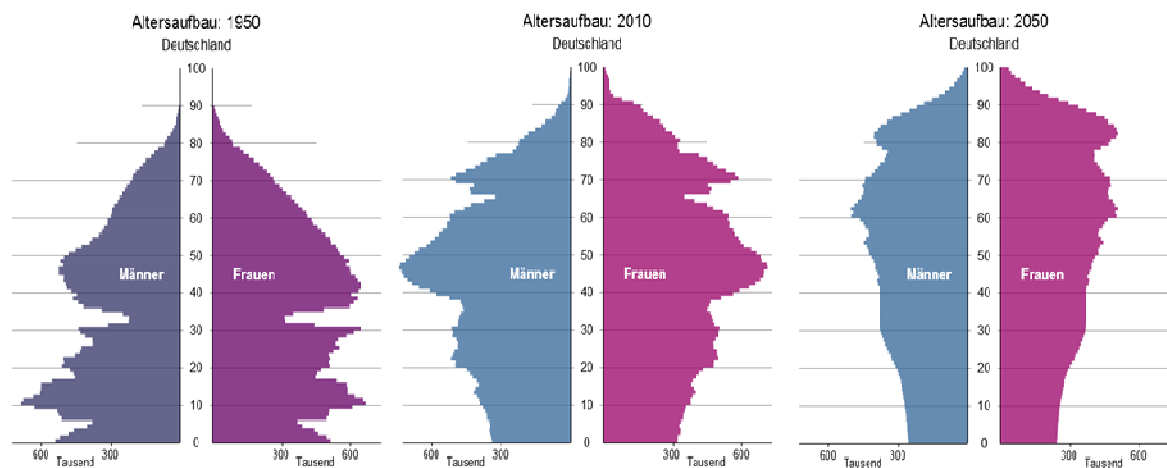


Abbildung 1

Altersentwicklung der deutschen Bevölkerung im Laufe von 100 Jahren (Quelle: Statistisches Bundesamt Deutschland, 2010)

2.2 Telomerbiologie und Seneszenz-regulierende Proteine

Der Begriff der Seneszenz beschreibt den Verlust der Teilungsfähigkeit einer Zelle und somit die irreversible Zellalterung. Auf zellulärer Ebene stellt die Telomerbiologie einen zentralen Punkt im komplexen Alterungsprozess dar. Telomere sind im Wesentlichen spezielle Nukleinsäuresequenzen und die endständigen Strukturen an allen eukaryotischen Chromosomen, die für die Stabilität der Chromosomen wichtig sind. Dabei bilden sie mit verschiedenen Regulationsproteinen sogenannte T-Loop Strukturen an den Enden der Chromosomen und schützen das Genom vor dem Abbau während der Zellteilung (Blasco et al., 2005). Das Enzym Telomerase mit seiner katalytischen Untereinheit Telomerase Reverse Transkriptase (TERT) ist die Hauptkomponente des Telomerkomplexes und reguliert die Stabilität der Chromosomen und die zelluläre Seneszenz durch das Ersetzen von Telomerfragmenten, die in der S-Phase des Zellzyklus verloren gegangen sind. Andere wichtige Proteine der T-Loop sind die Telomere Repeat-Binding Factors TRF1 und TRF2. Mit diesen steht ferner das heterodimere Protein Ku in Verbindung, welches bedeutsam für die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen ist. Zellzyklusinhibitoren wie z.B. p16, p53 und Chk2 (s.u.) sind zentrale Faktoren, die die Zellalterung vermitteln.

2.2.1 Der Telomerkomplex

Telomere menschlicher Zellen bestehen aus doppelsträngiger DNA mit 7 bis 20 Kilobasenpaaren (kbp) langen Wiederholungen der Basenabfolge „TTAGGG“. Direkt an diesen Sequenzen binden die Telomere Repeat-Binding Factors TRF1 und TRF2, welche mit anderen Proteinen interagieren und als Bindungsplattform für verschiedene Telomer-assoziierte Proteine dienen. Eine besondere Bedeutung kommt dabei dem Protein TRF2 zu, da es wesentlich für eine stabile Struktur der sogenannten T-Loops sorgt und so die Chromosomen vor Anomalien wie End-zu-End-Fusionen schützt (van Steensel et al., 1998). Ohne diese Sekundärstruktur könnten die Chromosomenenden von Kontrollmechanismen als Strangbrüche interpretiert werden, was Reparaturversuche zur Folge hätte. Im Gegensatz zu TRF2 kann TRF1 die Telomerlänge auch im negativen Sinn regulieren: in

bestimmten Modellen führte eine TRF1-Überexpression zu vermehrter Telomererosion durch Inaktivierung der Telomerase (Court et al., 2005).

Alle Aufgaben der einzelnen Proteine im Telomerkomplex sind noch nicht vollkommen verstanden, aber es ist anzunehmen, dass sie neben ihrer Hauptaufgabe die Telomere zu stabilisieren auch eine wichtige Signalfunktion bei Schäden an der DNA einnehmen (Danial et al., 2004, Fuster et al., 2006). **Abb. 2** zeigt eine schematische Darstellung der T-Loop-Struktur.

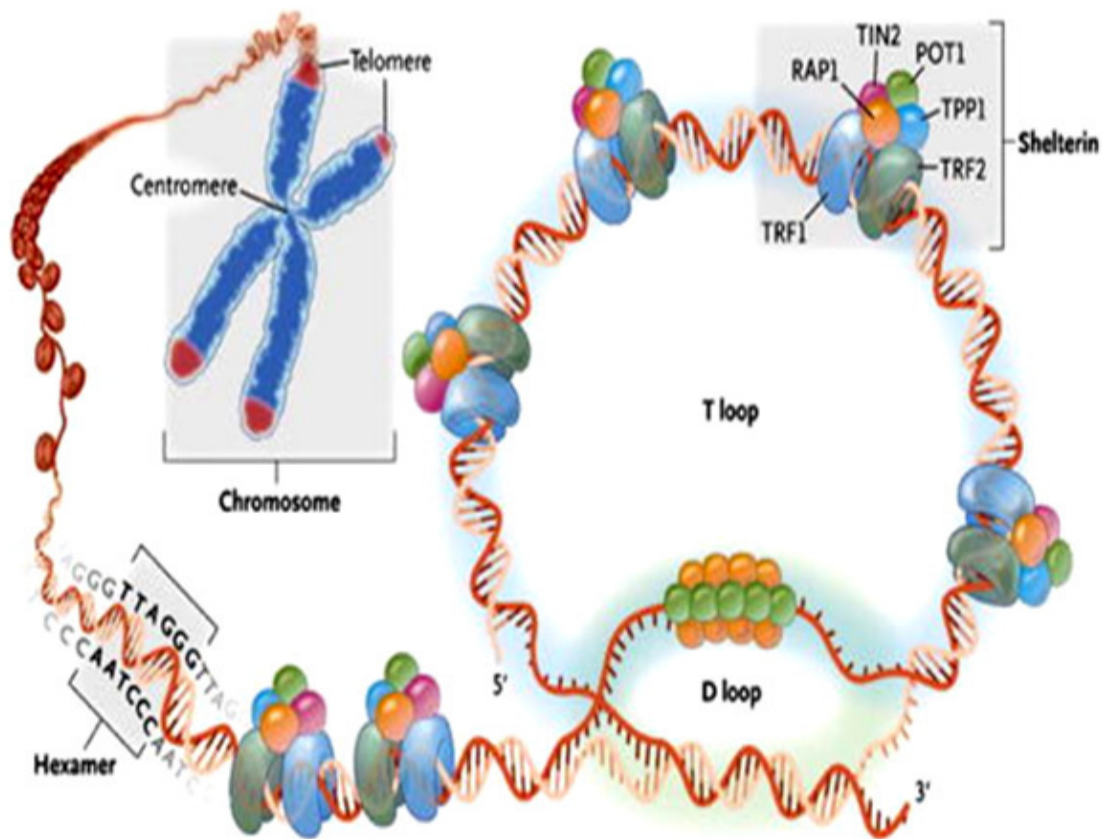


Abbildung 2

Schematische Darstellung der T-Loop-Struktur (Quelle: Calado & Young, NEJM, 2009)

Bei jeder Mitose gehen 50-200 Nukleotide verloren, die zu einem gewissen Maße durch das Enzym Telomerase wieder substituiert werden können. Nach ca. 50 Mitosen ohne aktive Telomerase sind die Telomere soweit erodiert, dass die Zelle in den permanenten Zellzyklusarrest bzw. die Seneszenz oder den programmierten Zelltod übergeht (Hayflick et al., 1961). Die Telomerase ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, welche zum einen aus der TERT und zum anderen aus einem RNA-Bestandteil, TERC genannt (telomerase RNA content), besteht, welcher als Matrize für den Wiederaufbau der Telomere dient. Die Telomerase hat die höchste Aktivität in Stammzellen und Tumorzellen. Eine schematische Darstellung der Elongation des Telomers zeigt **Abb. 3**.

Ein weiteres Protein, das als wesentlicher Bestandteil der DNA-Proteinkinase gilt, ist das heterodimere Protein Ku mit seinen Untereinheiten Ku70 und Ku80. Diese DNA-Proteinkinase ist wichtig für die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen (Suwa et al., 1996). Am Telomer selbst interagiert Ku mit den Proteinen TRF1 und TRF2.

Es ist bekannt, dass die Telomerlänge im Blut zirkulierender Leukozyten mit der kardiovaskulären Morbidität und Mortalität assoziiert ist und als Indikator für die Wirksamkeit therapeutischer Effekte verwendet werden kann (Brouillette et al., 2007, Wong et al., 2008, Farzaneh-Far et al., 2008).

2.2.2. Seneszenz-regulierende Proteine

Der Zellzyklus steht unter ständiger Kontrolle, um Zellen mit defektem Erbgut zu identifizieren, Reparaturvorgänge zu initiieren und den programmierten Zelltod auszulösen, falls die Reparatur versagt. Die Kontrollmechanismen sind komplex und vielschichtig, weil bei einer Fehlregulation des Zellzyklus Tumore entstehen können. Im Zusammenhang mit dieser Studie beschäftigten wir uns mit drei etablierten Markern der zellulären Alterung.

Das Tumorsuppressorprotein p16, auch bekannt als CDKN2A (Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A oder IKN4), ist ein Inhibitor Zyklin-abhängiger Kinasen, dessen Expression in Zellen und Geweben als Seneszenzmarker verwendet werden kann.

Ein Anstieg der p16-Konzentration ist mit Zellalterung verbunden sowie mit Nikotinkonsum und körperlicher Inaktivität assoziiert (Liu et al., 2009).

Das wichtigste Tumorsuppressorprotein ist p53. Der „Wächter des Genoms“ ist in ca. 50% aller menschlichen Tumore mutiert und kann sowohl DNA-Reparaturmechanismen aktivieren als auch die Zelle in den Wachstumsarrest oder die Apoptose führen. Eine Aktivierung des Proteins kann z.B. durch UV- oder ionisierende Strahlung und oxidativen Stress erfolgen. Ferner wurde gezeigt, dass eine Überaktivierung des p53 zu beschleunigter Alterung führt (Ferbeyre et al., 2002).

Die wichtigste Aufgabe der Cell Cycle Checkpoint-Kinase 2 (Chk2) ist es, Zellen mit DNA-Schäden oder fortgeschrittener Telomererosion zu erkennen und diese in den Zellzyklusarrest zu bringen, bis die Schäden repariert sind (Gire et al., 2004). Zum einen stabilisiert die Chk2 das Protein p53, wodurch die Seneszenz eingeleitet wird (Chehab et al., 2000). Andererseits steht sie aber auch mit dem Telomer-assoziierten Protein TRF2 in Verbindung, welches die Einleitung des Zellzyklusarrests durch Chk2 wiederum verhindern kann (Buscemi et al., 2009).

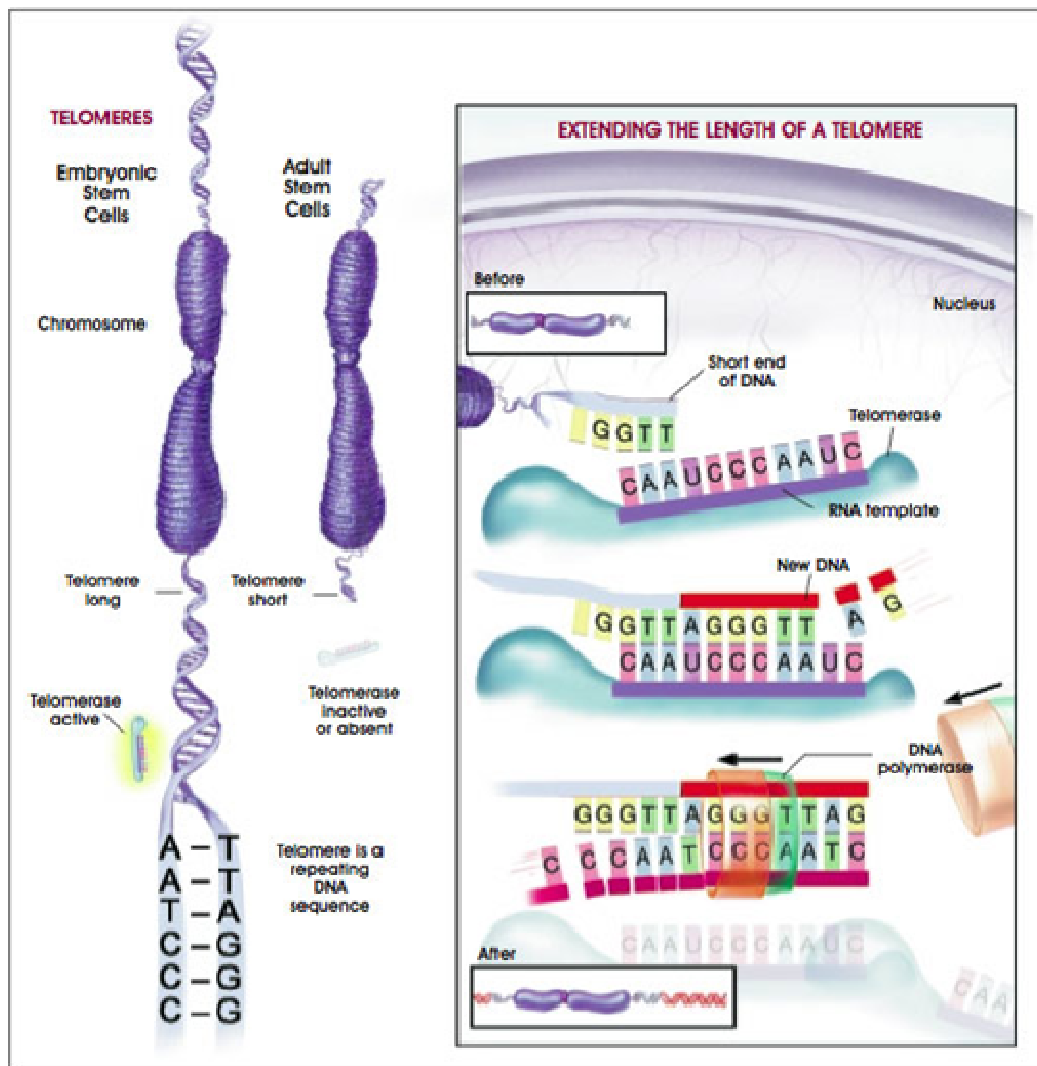


Abbildung 3

Telomere und Telomerase. Da sich Zellen teilen und differenzieren, werden die Telomere zunehmend verkürzt. Die Telomerase ist das Enzym, das die Telomere durch Substitution sich wiederholender Nukleotidsequenzen verlängert. Dazu bindet sie über ein RNA Template, welches zur Bindung eines neuen DNA-Stranges dient, an den Enden der Telomere. Zunächst werden mehrere sich wiederholende DNA-Sequenzen hinzugefügt, bevor die DNA-Polymerase den komplementären DNA-Strang bildet. (Quelle: Kim, Science, 1994)

2.3 Vorarbeiten

Die direkte Vorarbeit der Arbeitsgruppe zur vorliegenden Arbeit setzte das Modell des freiwilligen Laufradtrainings in Mäusen ein und kam zusammengefasst zu dem Ergebnis, dass sportliche Aktivität zu positiven Effekten auf myokardiale Telomerase und Telomer-regulierende Proteine sowie auf mit Überleben verbundene Signalwege und Apoptosevorgänge führt.

Mäuse laufen in einem Laufrad mit 12cm Durchmesser freiwillig im Mittel 4-5 km pro 24 Stunden. In diesem Modell wurde schon nach 3 Wochen eine Hochregulation der myokardialen Telomeraseaktivität, der TERT-Expression und der TRF2-Expression beobachtet. Dies war verbunden mit einer reduzierten Expression der pro-apoptotischen Mediatoren bzw. Zellzyklusinhibitoren Chk2, p16 und p53 auf Proteinebene. In Mäusen, bei denen die TERT durch Mutation funktionslos war, konnte durch sportliche Aktivität keine Regulation der genannten Proteine mehr erzeugt werden (Werner et al., 2008).

Die herausragende Bedeutung der Telomerase wurde jüngst durch die Verleihung des Nobelpreises für Medizin im Jahre 2009 an die Forschungsgruppe Blackburn & Greider (USA) nochmals unterstrichen, von der das Enzym im Jahre 1985 als verantwortlich für den Wiederaufbau der Telomere nach der Zellteilung beschrieben wurde (Greider et al., 1985).

Darüber hinaus ist sportliche Aktivität mit einer höheren Bioverfügbarkeit des endothelialen Stickstoffmonoxids (NO) verbunden. Dieses führt zu einer endothelabhängigen Vasodilatation, einer vaskuloprotektiven Signaltransduktion und steigert die Freisetzung endothelialer Progenitorzellen (EPC) aus dem Knochenmark. Diese haben wiederum positive Auswirkungen auf Angiogenese und vaskuläre Reparaturmechanismen und üben antioxidative Effekte aus (Laufs et al., 2004). In eNOS-Knockout-Mäusen konnte durch sportliche Betätigung keine Heraufregulation der Telomerase bzw. der Telomer-assoziierten Proteine mehr bewirkt werden (Werner et al., 2008).

Auch am Menschen ist die Erforschung der Telomerbiologie derzeit von großem Interesse. Die Studie von Cherkas et al. aus dem Jahr 2008 zeigte anhand der Untersuchung von 2401 Zwillingen, dass die leukozytäre Telomerlänge positiv mit sportlicher Freizeitaktivität assoziiert ist. Ebenso korreliert die Telomerlänge in Leukozyten stark mit der in Endothelzellen. So können bei kurzer Länge der

Telomere in peripher frei zirkulierenden Zellen Rückschlüsse auf ein vorangeschrittenes Altern der Gefäße gezogen werden (Wilson et al., 2008).

Um die physiologische Relevanz dieser Effekte zu überprüfen, wurden im Modell der akuten Doxorubizin-Kardiomyopathie mehrere Gruppen von Mäusen mit subletalen Dosierungen von Doxorubizin behandelt. Insbesondere wurden untrainierte Mäuse mit durch dreiwöchiges Lauftraining präkonditionierten Mäusen verglichen. Die durch Doxorubizininjektion auf das Mehrfache gesteigerte Kardiomyozytenapoptose war in den trainierten Tieren fast auf Kontrollniveau gesenkt. Dies legt einen protektiven anti-apoptotischen Effekt des körperlichen Trainings nahe, welcher in TERT-Knockout-Tieren nicht nachweisbar war. Diese hatten im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren sogar eine gesteigerte kardiale Apoptose.

2.4 Ziele der Arbeit

Der Einfluss von körperlicher Aktivität auf die molekularen Mechanismen der Zellalterung ist im Menschen bislang wenig erforscht. In Anbetracht der Ergebnisse der genannten Vorarbeiten stellte sich die Frage, inwiefern körperliches Training sich auf die Seneszenz und Telomerbiologie in menschlichen Zellen auswirkt. Deshalb untersuchten wir die Auswirkungen langfristigen Ausdauertrainings auf die Telomere und die Telomer-assoziierten Proteine in zirkulierenden Blutzellen von jungen Profisportlern und älteren Mastersathleten aus Sportarten wie Lang- und Mittelstreckenlauf, Marathon oder Triathlon durch den Vergleich mit bzgl. Alter und Geschlecht passenden Kontrollprobanden ohne regelmäßige sportliche Aktivität. Die vorliegende Arbeit soll folgende Fragen beantworten:

1. Unterscheiden sich die Expression Telomer-assoziiierter Faktoren und die Telomerlänge zwischen Sportlern und Nicht-Sportlern?
2. Werden Seneszenz- und Apoptose-vermittelnde Proteine in den zirkulierenden Blutzellen der Sportler weniger exprimiert?
3. Existieren Unterschiede zwischen jungen Athleten und Athleten mittleren Alters mit Jahrzehnte-langem Training?

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Verwendete Chemikalien und Reagenzien

1kb Plus DNA Ladder	(Invitrogen, Karlsruhe)
α-D(+)-Glukose	(Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
Acrylamid 30%	(Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA)
Ammoniumpersulfat (APS 10%)	(Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
Aprotinin	(Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
Aqua ad iniectabilia	(Braun, Melsungen)
Aqua dest.	(Braun, Melsungen)
Biocoll Separating Solution	(Biochrome AG, Berlin)
Bromphenolblau	(Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
BSA	(Merck, Darmstadt)
Chloroform	(Merck, Darmstadt)
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	(Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
Dimethylsulfoxid (DMSO, reinst)	(Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
di-Natriumhydrogenphosphat	(Merck, Darmstadt)
Dithiotreitol (DTT)	(Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
Dodecylsulfat Natriumsalz (SDS)	(VWR International, Darmstadt)
ECL	(GE Healthcare, Buckinghamshire, UK)
Essigsäure zur Analyse (Eisessig)	(Merck, Darmstadt)
Ethanol	(Merck, Darmstadt)
Ethidiumbromid	(Merck, Darmstadt)
Ethylendiamidtetraessigsäure (=EDTA)	(Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
FACS-Flow	(BD Biosciences, Erembodegem-Aalst)
FITC-PNA-Sonde	(Cambridge Research Biochemicals, UK)
Formamid	(Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
Fötales Kälberserum (FKS)	(Gibco, Invitrogen, Karlsruhe)
Glycerol	(Sigma-Aldrich, Deisenhofen)

Glycin	(VWR International, Darmstadt)
HEK-Zellen	(Gibco, Invitrogen, Karlsruhe)
Hepes	(Serva, Heidelberg)
Isopropanol	(Merck, Darmstadt)
Kaliumdihydrogenphosphat	(Merck, Darmstadt)
Kaliumchlorid	(Merck, Darmstadt)
LDS 751	(Exciton, München)
Leupeptin	(Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
Low Range Marker	(Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA)
Methanol	(Merck, Darmstadt)
MgCl₂	(Roche Group, Mannheim)
Natriumdihydrogenphosphat	(Merck, Darmstadt)
Natriumchlorid	(Merck, Darmstadt)
peqGOLD dNTP-Mix	(Peqlab, Erlangen)
peqGOLD RNAPure	(Peqlab, Erlangen)
peqGOLD Universal-Agarose	(Peqlab, Erlangen)
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	(Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
Platinum SYBR Green qPCR Supermix-UDG	(Invitrogen, Karlsruhe)
Protein-Assay Reagent A	(Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA)
Protein-Assay Reagent B	(Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA)
RNasin (RNase Inhibitor)	(Promega, Madison, USA)
ROX reference dye	(Invitrogen, Karlsruhe)
RPMI-1640-Medium	(PAA Laboratories, Linz, Österreich)
Taq-Polymerase	(Peqlab, Erlangen)
Temed (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)	(Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
TRAPeZe 1x CHAPS Lysis Buffer	(Chemicon International)
Tris-hydroxy-methyl-aminomethan	(Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
Trockenmilchpulver	(TSI GmbH, Zervon)
Tween20	(Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
Xylen cyanol F	(Sigma-Aldrich, Deisenhofen)

3.1.2 Antikörper und Primer

3.1.2.1 Primärantikörper

GAPDH, Mouse IgG	6C5 Santa Cruz, sc-32233 Verdünnung 1:1000
p16, Mouse IgG	F-12 Santa Cruz, sc-1661 Verdünnung 1:250
p53, Rabbit IgG	FL-393 Santa Cruz, sc-6243 Verdünnung 1:500
TRF2, Rabbit IgG	H-300 Santa Cruz, sc-9143 Verdünnung 1:200

3.1.2.2 Sekundärantikörper

Anti-Rabbit IgG-Peroxidase	(Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
Anti-Mouse IgG-Peroxidase	(Sigma-Aldrich, Deisenhofen)

3.1.2.3 Primer PCR

GAPDH-for	5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3'	60 °C, 30 Zyklen
GAPDH-rev	5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3'	
TRF2-for	5'-TGT CTG TCG CGG ATT GAA GA-3'	53 °C, 35 Zyklen
TRF2-rev	5'-GCT GGA AGG TCT CAT ATG AA-3'	
Chk2-for	5'-GCA GCA GTG CCT GTT CAC A-3'	55 °C, 35 Zyklen
Chk2-rev	5'-TGG ATA TGC CCT GGG ACT GT-3'	
Ku70-for	5'-GAG CAT CCA GTG TAT CCA AA-3'	52 °C, 35 Zyklen
Ku70-rev	5'-CAG CAT GAT CCT CTT ATG AC-3'	
Ku80-for	5'-TCA CAG TGC ACA GAC ATC TG-3'	56 °C, 40 Zyklen
Ku80-rev	5'-AAT TGC AGG GAG ATG TCA CA-3'	

3.1.2.4 Primer Real-Time PCR

Telo-for	CGGTTTGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTT
Telo-rev	GGCTTGCCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCT
36b4-for	CAGCAAGTGGGAAGGTGTAATCC
36b4-rev	CCCATTCTATCATCAACGGGTACAA

ACX-Primer	GCGCGGCTTACCCTTACCCTTACCCTAACC
TS-Primer	AATCCGTCGAGCAGAGTT

3.1.3 Puffer und Lösungen

3.1.3.1 Allgemein verwendete Puffer und Stammlösungen

10xPBS	80 g NaCl (1,37 M/l), 2g KCl (27 mM/l), 2,4 g KH ₂ PO ₄ (18 mM/l), 14,4 g Na ₂ HPO ₄ (101 mM/l), (pH 7,4; ad 1 l mit A. dest)
---------------	---

10xPBS Tween 1%	80 g NaCl (1,37 M/l), 2 g KCl (27 mM/l), 2,4 g KH ₂ PO ₄ (18 mM/l), 14,4 g Na ₂ HPO ₄ (101 mM/l), 10 ml Tween 20, (pH 7,4; ad 1 l mit A. dest)
------------------------	--

3.1.3.2 Speziell verwendete Puffer und Lösungen

DNA

50xTAE	484 g NaCl (4,14 M/l), 37,2 g EDTA (64 mM/l), 116 ml Eisessig (10 mM/l), (pH 8,4; ad 2 l mit A. dest.)
---------------	--

DNA-Gel	1,2 g Universalagarose, 100 ml 1x TAE-Puffer, 4 µl Ethidiumbromid
----------------	---

DNA-Ladepuffer	3 ml Glycerol, 7 ml Aqua dest, 0,5 g Xylen Cyanol F
-----------------------	---

Western Blot

Proteinlysepuffer	5 ml Tris (1M, pH 6,8), 10 ml 10% SDS, 10 ml Glycerol, 15 ml Aqua dest.; Jeweils vor Gebrauch zu 1 ml Lysepuffer: 1 µl PMSF, 1 µl Leupeptin, 0,7 µl Aprotinin
--------------------------	---

Ladepuffer	2 ml Glycerol, 2 ml 10% SDS, 2,5 ml Stacking Gel Buffer, 3 ml Aqua dest., Bromphenolblau zum Anfärben; Jeweils vor Gebrauch: 50 µl DTT (1M) + 950 µl Ladepuffer
-------------------	---

Stacking Gel Buffer	6,06 g Tris, 4 ml 10% SDS, (pH 6,8, ad 100 ml mit A. dest.)
Trenngel (für 2 Gele)	7,9 ml A. dest, 6,7 ml Acrylamid 30%, 5 ml Tris pH 8,8 1,5 M, 0,2 ml APS 10%, 0,2 ml SDS 10%, 0,008 ml Temed
Sammelgel (für 2 Gele)	3,4 ml A. dest, 0,83 ml Acrylamid 30%, 0,63 ml Tris pH 6,8 1 M, 0,05 ml APS 10%, 0,05 ml SDS 20%, 0,005 ml Temed
10xElektrophoresepuffer	720 g Glycin, 151,5 g Tris, 50 g SDS, (ad 5 l mit A. dest)
Transferpuffer	2,9 g Tris, 14,5 g Glycin, 20 ml Methanol (ad 1 l mit A. dest)
<u>Flow-FISH</u>	
Einfriermedium	FKS, 10% DMSO
Äquilibrierungspuffer	2,5 g α -D(+)-Glukose, 50 mg BSA, 500 μ l 1 M Hepes, (ad 50 ml mit A. dest)
Hybridisierungspuffer	18,75 ml deionisiertes Formamid, 0,5 ml 1 M Tris, 0,5 ml 1 M NaCl, 0,25 g BSA in 5 ml ddH ₂ O gelöst
Waschpuffer 1	37,5 ml deionisiertes Formamid, 50 mg BSA in 12 ml ddH ₂ O gelöst, 0,5 ml 1 M Tris (pH 7,1), 50 μ l Tween 20

3.1.4 Molekularbiologische Kits

Omniscript RT-Kit	(Quiagen, Hilden, Deutschland)
QIAamp DNA Blood Mini Kit (50)	(Quiagen, Hilden, Deutschland)
PCR-Kit peqGOLD	(Peglab, Erlangen)

3.1.5 Filter und Membranen

Extra Thick Filter Paper 15x20cm	(Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA)
Nitrocellulosemembran	(Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA)

3.1.6 Geräte

a) Allgemein:

Autoklav	(Tuttnauer Systec 3050 EL)
Heizblöcke	(Eppendorf Thermomixer Comfort - Boekel Industries Model 110001 - Unitek HB-130)
Kühlzentrifuge	(Sigma 1K15)
Magnetrührer	(Combimac RCH, Janke und Kunkel, IKA Labortechnik)
pH-Meter 526	(WTW, Weilheim)
Photometer	(DU 730 Life Science UV/Vis, Beckman- Coulter)
Tischzentrifugen	(Heraeus Biofuge pico)
Vortexer	(VF2, Janke und Kunkel, IKA Labortechnik)
Waagen	(Acculab UK, Edgewood, NY)
- VIC-Series 0.01g Precision Balances	
- ALC-Series 0.0001g Analytical Balances	

b) Zellisolation:

Mikroskop	(Olympus CK2)
Zentrifuge	(Megafuge 1.0, Heraeus Sepatech)

c) DNA / RNA:

Elektrophoresekammer	(Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA)
Powerpack	Consult E 831, Peglab)
Thermo Cycler	(Px2 Thermal Cycler, Thermo Electron Co.)
UV-Tisch	(Gene genius, Bio image systems)
Wasserbad	(GFL 1086)

d) Western Blot:

Entwicklerautomat	(Curix 60, Agfa, Mortsel, Belgien)
Powerpack 200 Power Supply	(Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA)
Schüttler Polymax 1040	(Heidolph Instruments, Schwabach)
Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell	(Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA)
Überkopfschüttler REAX 2	(Heidolph Instruments, Schwabach)

e) FlowFISH:

FacsCalibur	(Becton Dickinson, Heidelberg)
--------------------	--------------------------------

f) Real-Time PCR:

7900 HT Sequence Detector	(Applied Biosystems, Deutschland)
----------------------------------	-----------------------------------

g) TRAP-Assay:

LightCycler-System	(Roche, Mannheim)
Glaskapillaren	(Roche, Mannheim)

3.1.7 Software

CellQuest Pro	(BD Biosciences, Erembodegem-Aalst)
Labworks V4.6	(UVP, Upland, CA, USA)
LightCycler Software V3.0	(Roche, Mannheim)
StepOne Software V2.0	(Applied Biosystems, Deutschland)
XnView	(Pierre-Emmanuel Gougelet, Reims)

3.2 Methoden

3.2.1 Probandenrekrutierung und Materialgewinnung

Die Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für Sport- und Präventivmedizin der Universität des Saarlandes, Saarbrücken. Sie wurde von der Ethikkommission des Saarlandes bewilligt (Votum Nr. 116/07). **Abb. 5** zeigt einen Überblick über die Studienteilnehmer. Als Probanden dienten junge Leistungssportler der deutschen Jugendnationalmannschaft aus den Disziplinen Mittel- und Langstreckenlauf ($n=32$, Durchschnittsalter $20,4\pm 3,3$ Jahre, 25 männlich, 7 weiblich, durchschnittliche Trainingsdistanz $72,9\pm 27,1$ km pro Woche). Weiterhin wurden „Mastersathleten“ aus den Bereichen Marathon und Triathlon, die regelmäßiges Ausdauertraining betreiben und an Wettkämpfen teilnehmen untersucht ($n=25$, Durchschnittsalter $51,1\pm 7,8$ Jahre, 19 männlich, 6 weiblich, durchschnittliche Trainingsdistanz $80\pm 15,7$ km pro Woche, sportlich aktiv ohne größere Unterbrechung seit durchschnittlich $35\pm 2,7$ Jahren). Bei diesen Menschen handelt es sich um eine hochselektionierte Gruppe von Menschen mit jahrzehntelanger intensiver sportlicher Aktivität. Weiterhin wurden zwei Kontrollgruppen von Menschen untersucht, die weniger als eine Stunde Sport pro Woche treiben (junge Gruppe: $n=26$, Durchschnittsalter $21,8\pm 2,8$ Jahre, 15 männlich, 11 weiblich; ältere Gruppe: $n=21$, Durchschnittsalter $50,9\pm 7,6$ Jahre, 14 männlich, 7 weiblich). Alle Teilnehmer waren Nichtraucher, zur Zeit der Untersuchung gesund und frei von chronischen Erkrankungen. Für die Studie geeignete Probanden wurden im Vorfeld durch einen Fragebogen selektiert. Zur Erfassung der aktuellen sportlichen Leistungsfähigkeit durchliefen alle Sportler und Nicht-Sportler eine Fahrradergometrie nach Standardbedingungen (Lode Excalibur; Firma Lode, Groningen, Niederlande) (**Abb. 5**). Beginnend bei 50 Watt Leistung wurde diese dreiminütlich um weitere 50 Watt gesteigert. Zu jeder Minute erfolgte die Ableitung eines 12-Kanal-EKGs. Nach der zweiten Minute der jeweiligen Stufe wurde der Blutdruck gemessen, nach der dritten Minute die Herzfrequenz erfasst. Abbruchkriterien waren muskuläre Ermüdung, Dyspnoe, Angina pectoris oder Rhythmusstörungen. Keiner der Probanden zeigte während der Ergometrie Anzeichen einer kardiovaskulären Erkrankung.

Die Entnahme von 40 ml Citratblut und 10 ml Serumblut erfolgte durch Punktion einer Ellenbeugenvene nach Einverständniserklärung an 104 freiwilligen Studienteilnehmern. Das Citratblut diente der Durchführung der geplanten Experimente. Im Serum wurden für jeden Probanden die Glukosekonzentration und das Lipidprofil im Zentrallabor des Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg, erstellt (**Abb. 5**).

3.2.2 Zellisolation

Die Isolation mononukleärer Zellen erfolgte aus 40 ml Citratblut mittels Dichtegradientenzentrifugation unter Einsatz der Biocoll Separating Solution. Zunächst wurden jeweils 20 ml Citratblut in einen 50 ml Falcon überführt und mit 15 ml 1xPBS vermischt. In zwei weitere 50 ml Falcons wurden jeweils 15 ml Biocoll Separating Solution vorgelegt, um diese danach vorsichtig mit dem Blut-PBS-Gemisch zu überschichten. Zur Auftrennung der einzelnen Phasen erfolgte eine Zentrifugation bei 2400 rpm für 20 min mit langsamem Auslaufen der Zentrifuge ohne Bremse für weitere 20 min. Es bildeten sich 4 Phasen, von denen die obere Interphase die mononukleären Zellen (MNCs) enthielt (**Abb. 4**). Diese wurde behutsam aber gründlich abpipettiert, ohne die Unterphase zu berühren und im Anschluss in ein neues 50 ml Falcon überführt. Durch Auffüllen auf 50 ml mit 1xPBS erfolgte das Waschen der Zellen und durch erneute Zentrifugation bei 2400 rpm für 10 min (mit Bremse) die Pelletierung.

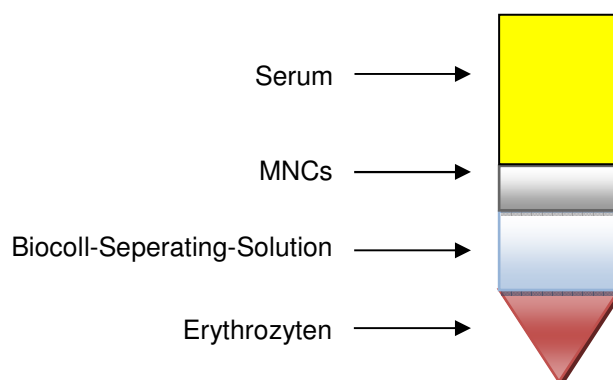


Abbildung 4

Schematische Darstellung der Dichtegradientenzentrifugation mit Biocoll-Separating-Solution zur Isolation der mononukleären Zellen (MNCs)

Am Boden der zwei Falcons entstanden so pro Proband nach Abgießen des Überstandes Zellpellets, die in 10 ml 1xPBS resuspendiert und zu einer gemeinsamen Zellsuspension gepoolt wurden. Nach Auffüllen mit 1xPBS auf 30 ml erfolgte als zweiter Waschschrift eine letzte Zentrifugation mit 2400 rpm (mit Bremse). Das finale Pellet wurde in 8 ml 1xPBS aufgenommen, um danach für die geplanten Experimente wie folgt auf unterschiedliche Reaktionsgefäße verteilt zu werden:

- 1 ml zur RNA-Isolation
- 1 ml zur CHAPS-Isolation
- 1 ml zur DNA-Isolation
- 1 ml zur FlowFISH-Messung
- 2 ml zur Proteinisolation
- 2 ml als Reserve

Danach wurde mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer die Anzahl der isolierten Zellen ermittelt. Durchschnittlich konnten zwischen 40 und 80 Millionen mononukleäre Zellen auf diese Weise aus 40 ml Blut der Probanden separiert werden.

Zur Weiterverwendung wurden die einzelnen Zellisolate in einer Tischzentrifuge für 10 min bei 3000 rpm (Biofuge pico) pelletiert, der Überstand entfernt und das Pellet in dem entsprechenden Lysepuffer oder Einfriermedium aufgenommen.

3.2.3 RNA-Isolation, Reverse Transkription der Gesamt-RNA und Polymerase-Kettenreaktion

3.2.3.1 Gesamt-RNA Isolation für PCR

Das Zellisolat wurde in 1 ml peqGOLD RNAPure lysiert und bei –20 °C gelagert oder sofort weiter verarbeitet. Zur Nukleinsäureisolation wurde zunächst die Zellsuspension nach Zusetzen von 300 µl Chloroform unter einem Abzug zur Entfernung der Proteine auf einem Vortexer gemischt, bis eine trübe Lösung entstand, die dann für 30 min bei 4 °C und 14.000 rpm zentrifugiert wurde. Es bildeten sich 3 Phasen, von denen die wässrige Oberphase vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 400 µl kaltem Isopropanol versetzt wurde. Anschließend musste das Gemisch zur Optimierung der RNA-Ausfällung für

mindestens eine Stunde bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ lagern, bevor der Isolationsvorgang durch erneutes Zentrifugieren bei 14.000 rpm und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 60 min fortgesetzt wurde. Nach Absaugen des Überstandes und Zugabe von 800 μl Ethanol (70% in RNase-depletiertem DEPC-Wasser) zum Waschen wurde wieder für 15 min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und das Zellpellet zum Trocknen bei Raumtemperatur für mindestens 30 min unter den Abzug platziert. Zur gründlichen Resuspendierung der Pellets wurden 15-30 μl DEPC-Wasser benutzt. Anschließend wurde bei $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 5 min erhitzt und danach die Gesamt-RNA am UV-Photometer quantifiziert. Das Isolat wurde bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

3.2.3.2 Reverse Transkription

Zur Herstellung von cDNA für die anschließende Polymerase-Kettenreaktion wurden unter Verwendung des Omniskript-RT Kits 2 μg der Gesamt-RNA eingesetzt. Diese 2 μg RNA wurden auf 10 μl mit DEPC-Wasser aufgefüllt, mit weiteren 10 μl eines Master-Mix-Ansatzes (2 μl 10x Buffer RT, 2 μl dNTP Mix 5 mM, 2 μl Random Primer, 1 μl RNase Inhibitor RNasin 10 U/ μl , 1 μl Omniscript RT Enzym, 2 μl DEPC-Wasser) vermischt und anschließend für eine Stunde bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Wasserbad inkubiert. Eine Erhitzung des Ansatzes auf $93\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 5 min inaktivierte abschließend die Reverse Transkriptase. Die Lagerung der so synthetisierten cDNA erfolgte bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.3.3 Polymerase-Kettenreaktion

Nach der Isolation der Gesamt-RNA und dem Umschreiben auf cDNA durch Reverse Transkription (RT) wurden Polymerase-Ketten-Reaktionen (PCRs) durchgeführt, um die Expression Telomer-assoziiierter Faktoren auf mRNA-Ebene beurteilen zu können. Expressionsunterschiede konnten nach Auftragen auf einem DNA-Gel (s.o.) densitometrisch gemessen werden. Als Referenz-Gen diente die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), welche als Housekeeping-Gen nicht reguliert wird (Solch et al., 1996).

Zu 2 μl RT-Produkt kamen standardmäßig 48 μl eines Mastermixes (1 μl Forward Primer, 1 μl Reverse Primer, 1 μl DNTP-Mix, 5 μl 10x Reaction Buffer, 1 U bzw. 0,2 μl Taq DNA-Polymerase, 39,8 μl Ampuwa). Anschließend wurden die Proben gevortext, herunterzentrifugiert und danach in den ThermoCycler gestellt, wo sie folgende Reaktionsschritte durchliefen:

1. Initialer Denaturierungsschritt bei 95 °C für 5 min
2. PCR-Zyklus bei Primer-Annealing-Temperatur (s.o. für jeden Primer) für 60 s, danach 72 °C für 90 s (Taq-Polymerase-Arbeitstemperatur) und für 60 s bei 95 °C (Denaturierung)
3. Nach Ablauf der vorgegebenen Zyklenzahl 72 °C für 10 min
4. Abschließend Abkühlung auf 4 °C und Beenden des Laufes.

3.2.4 Proteinexpression und Western Blot

Das Western Blot-Verfahren stellt eine molekularbiologische Methode zur semi-quantitativen Proteinexpressionsanalyse dar. Dazu wurde aus Zelllysaten gewonnenes Gesamtprotein gelelektrophoretisch aufgetrennt, um Proteine gemäß ihrer Molekulargröße zu separieren. Die aufgetrennten Proteine wurden von dem Gel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen (Blot) und mit einem spezifischen, gegen das gesuchte Protein gerichteten Primärantikörper inkubiert. Nach Abwaschen der ungebundenen Antikörperfragmente wurde die Membran mit einem Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper inkubiert. Nach erneutem Abwaschen wurde ein Farbstoff hinzugegeben, welcher Peroxidase-katalysiert zu fluoreszieren begann. Die Fluoreszenz war proportional zur Proteinexpression und wurde mit Hilfe eines Autoradiographiefilms sichtbar gemacht. Die so abgebildeten bandenförmigen Signale wurden durch Densitometrie quantifiziert.

3.2.4.1 Proteinbestimmung nach Lowry

Zunächst wurden die Zellen in 200-400 µl frisch angesetztem Lysepuffer für Proteine (s.o.) aufgenommen und bei 95 °C für 5 min gekocht. Die Bestimmung der Proteinkonzentration im Gesamtzelllysat aus den mononukleären Zellen der Athleten und der Kontrollprobanden erfolgte nach der kolorimetrischen Methode von Lowry (Lowry et al., 1951). Im ersten Schritt der Proteinbestimmung wird dabei ein Kupfer-Protein-Komplex in alkalischer Lösung gebildet (D_C Protein Assay Reagent A, Bio-Rad). Dieser Komplex reduziert ein zugegebenes Phosphomolybdat-Phosphowolfram-Reagens (D_C Protein Assay Reagent B, Bio-Rad), wobei sich die Lösung in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration mehr oder weniger intensiv blau färbt. Die Absorption der Lösung wurde bei 540 nm

photometrisch quantifiziert. Zur Generierung der Standardkurve diente bovines Serumalbumin.

3.2.4.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Um die Expression des interessierenden Proteins zwischen den vier verschiedenen Gruppen vergleichen zu können, wurden jeweils 50 µg Gesamproteintlysat auf ein 10% SDS-Polyacrylamidgel geladen und elektrophoretisch aufgetrennt. Die Elektrophorese wurde in Anwesenheit einer äquivalenten Menge an Protein-Ladepuffer durchgeführt.

3.2.4.3 Protein-Transfer (Blotvorgang)

Die Übertragung der Proteine aus dem Gel auf eine Nitrozellulose-Membran (Blotten) erfolgte mit Hilfe eines Transferpuffers und Filtern sowie der Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad). Die Nitrozellulose-Membran wurde anschließend für ca. 30 min bei Raumtemperatur in einer 5%-igen Trockenmilch+PBS-Tween-Lösung belassen, um freie Oberflächen-Bindungsstellen zu blocken.

3.2.4.4 Antikörperinkubation

Um die Konzentration der unterschiedlichen Proteine auf der Nylonmembran zu untersuchen, wurde sie mit einem spezifischen Primärantikörper in 1% Trockenmilch+PBS-Tween (s.o.) über Nacht bei 4 °C auf einem Schüttler inkubiert. Die nichtgebundenen Antikörper wurden am Folgetag mit PBS-Tween-Puffer abgewaschen. Danach wurde die Membran mit einem Peroxidase-konjugiertem Sekundärantikörper (s.o.) für 30 min bei Raumtemperatur in 1xPBS inkubiert. Die ungebundenen Antikörper wurden wiederum mit PBS-Tween-Puffer abgewaschen. Die an die Proteinbanden gebundenen Fragmente wurden mit dem ECL-Kit (enhanced chemiluminescence) auf Autoradiographiefilmen sichtbar gemacht und densitometrisch quantifiziert.

3.2.5 Telomerlängenmessung mittels Flow-FISH

Zur Bestimmung der Telomerlänge wurde die Flow-FISH Methode eingesetzt (Rufer et al., 1998). Diese ist eine Kombination aus Fluoreszenz in-situ Hybridisierung (FISH) und Durchflusszytometrie. Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur Analyse von Zellen in Suspension auf der Grundlage von Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften. Die Kombination aus FISH und Durchflusszytometrie ermöglicht eine Aussage über die Telomere in individuellen Zellen und bringt den Vorteil mit sich, dass auch ruhende Zellen analysiert werden können. Zur Hybridisierung wurde eine mit Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC) fluoreszenzmarkierte Peptid-Nukleinsäure(=PNA)-Probe verwendet. Diese bietet gegenüber konventionellen DNA-Sonden den Vorteil, stärker und spezifischer an die denaturierten DNA-Einzelstränge zu binden (Egholm et al., 1993).

3.2.5.1 Vorbereitung der Zellen

Bis zur endgültigen Verwendung der MNCs für das Flow-FISH-Experiment wurden diese bei -180 °C in 1 ml fötalem Kälberserum (FKS)+10% DMSO (Einfriermedium) in einem CryoTube (NUNC Nalgene) resuspendiert und gelagert. Zum gleichmäßigen Absenken der Temperatur wurden die Tubes für 24 Stunden in einem Cryo 1 °C Freezing Container (Nalgene) belassen und dann in den flüssigen Stickstoff überführt.

Pro Untersuchung wurden 600.000 Zellen verwendet. Zunächst wurden die Zellen auf Eis aufgetaut und sobald wie möglich mit 9 ml RPMI-1640-Medium aufgefüllt und 7 min bei 900 g zentrifugiert. Das Pellet wurde dann in 500 µl Äquibrierungspuffer resuspendiert und nochmals für 7 min bei 900 g zentrifugiert. Danach wurde der Überstand sorgfältig und vollständig abpipettiert. Der Äquibrierungspuffer wurde sehr gründlich abpipettiert, um eine Beeinflussung der Telomerlängenmessung zu vermeiden.

3.2.5.2 DNA-Denaturierung

Die Zellen wurden anschließend in 600 µl Hybridisierungspuffer vorsichtig, blasenfrei und unter Sicht resuspendiert. Die Lösung wurde 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, was die Permeabilisierung der Zellen zur Folge hatte, um der Telo-PNA-Sonde später die Penetration durch die Zellmembranen in den

Zellkern zu ermöglichen. Dann erfolgte die Denaturierung der Zellen im Wasserbad bei 85 °C für 12 min. Im Anschluss mussten die Proben für 2 min auf Eis gestellt und anschließend zentrifugiert werden.

3.2.5.3 DNA-Hybridisierung

Nach Zugabe von 0,03 µg/100.000 Zellen Telo-PNA wurde mittels eines Vortexers kurz gemischt. Anschließend kamen die Proben 90min in eine Dunkelkammer. In dieser Zeit lagerte sich die komplementäre Telo-PNA an die DNA, sodass alle Telomere mit Telo-PNA besetzt waren.

3.2.5.4 Waschschritte und DNA-Gegenfärbung

Die Proben wurden einmal mit 900 µl Waschpuffer 1 (s.o.) gewaschen und zentrifugiert (4200 rpm, 7 min), um die nicht gebundene Telo-PNA auszuspülen. Der Überstand wurde bis auf 100 µl abgesaugt und die Zellen danach nochmals mit 600 µl Waschpuffer 1 gewaschen. Nach erneutem Absaugen des Überstandes bis auf 100 µl wurden die Proben dann mit 400 µl LDS 751, dem Farbstoff, der sich in die Doppelstrang-DNA einlagert, für mindestens 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Diese DNA-Gegenfärbung ist eine interne Qualitätskontrolle und diente bei der nachfolgenden durchflusszytometrischen Untersuchung der Identifizierung von kernlosen Zellen mit unspezifischer Bindung und so genannten „Doubletten“, d.h. Ereignissen bei welchen das Durchflusssytometer fälschlicherweise zwei Zellen als singuläres Event erfasst, was aufgrund der in zwei Zellen doppelt vorhandenen Telomere zu einem falsch hohen Telomerfluoreszenzsignal führen würde. Bis zur Analyse wurden die Proben lichtgeschützt bei 4 °C gelagert.

3.2.5.4 Analyse am Durchflusssytometer und Auswertung

Die Messung der Telomerlänge erfolgte durch quantitative Fluoreszenzmessung anhand der hybridisierten, fluoreszierenden Telo-PNA am FACSCalibur (Beckton Dickinson), die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software CellQuest Pro. Um die täglichen Schwankungen auszugleichen, wurden FITC-konjugierte Beads benutzt, die jeweils definierte Mengen an Fluoreszenz, die sogenannten MESF (Molecules of equivalent soluble fluorochrome), aufwiesen. Diese wurden an jedem Messtag zusätzlich zu den Proben getestet. Des Weiteren waren in jedem Lauf

Negativkontrollen (Probe ohne PNA-Sonde) und die Probe einer nicht zur Studienpopulation gehörenden Person als Referenz-Kontrolle vorhanden. Alle Proben der Studie wurden in zwei Läufen komplett gemessen, um zusätzlich Tagesschwankungen auszugleichen. Die durch die Flow-FISH-Messung erhaltenen mittleren Fluoreszenzwerte (MFI – mean fluorescence intensity) wurden über eine früher etablierte Southern Blot Standardkurve in Kilobasenpaare (kbp) umgerechnet.

3.2.6 Telomerlängenmessung mittels Real-Time-PCR

Eine neuere Methode, um die Telomerlänge zu erfassen, ist die Real-Time-PCR. Diese vergleicht die Anzahl der Kopiesequenzen der Telomere mit dem Gen 36b4, welches nur in einer einzigen Kopie pro Genom vorkommt (Cawthon et al., 2003). Zunächst wurde mit Hilfe des Qiamp DNA Blood Mini Kits (Quiagen, Deutschland) die genomische DNA der mononukleären Zellen aller Probanden isoliert und bis zur Durchführung der RT-PCR bei -20 °C konserviert. Während der Optimierung des Assays entstand sowohl für die Telomer- als auch für die 36b4-PCR eine 6-Punkt-Standardkurve (zweifache Verdünnung von 40 ng–1,25 ng) aus einer Gruppe von 10 gepoolten Kontroll-DNAs, um eine Linearität zu gewährleisten ($R^2 > 0,99$). Die Kontroll-DNA wurde in jedem Lauf mitgemessen, um eine Vergleichbarkeit der Einzelläufe zu erlauben. Als Negativkontrolle diente PCR-Mastermix ohne DNA (No template control, NTC).

3.2.6.1 Durchführung und Auswertung

Nach Isolation der DNA der mononukleären Zellen wurde deren Konzentration in der Lösung gemessen. Zu 20 ng DNA kamen 25 µl eines Mastermixes (12,5 µl Platinum SYBR Green qPCR Supermix-UDG, 0,5 µM/l ROX reference dye, 150 nmol/l eines telomerspezifischen Primers (s.o.): forward: CGGTTTGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTT; reverse: GGCTTGCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCT bzw. 100 nmol/l des 36b4 Primers (s.o.): forward CAGCAAGTGGGAAGGTGTAATCC; reverse CCCATTCTATCATCAACGGGTACAA. Im Anschluss erfolgte mit den Proben die PCR in einem 7900 HT Sequence Detector (Applied Biosystems, Deutschland) mit folgenden Reaktionsschritten:

1. Aktivierungsschritt bei 95 °C
2. 40 Zyklen für 15 s bei 95 °C und 60 s bei 58 °C
3. Erstellung einer Schmelzkurve (zur Sicherstellung, dass ein spezifisches PCR-Produkt amplifiziert wurde)

Die Messung erfolgte für jede Probe als Doppelbestimmung. Um die relative Differenz der Telomer-Repeat-Sequenzen der DNA zwischen den Athleten den von Alter und Geschlecht am besten passenden Kontrollpersonen zu ermitteln, erfolgte die Auswertung der erfassten Daten mittels der vergleichenden $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode.

3.2.7 Telomeraseaktivitätsmessung mittels TRAP-Assay

Die Telomeraseaktivität wurde über eine enzymatische Reaktion in Verbindung mit einer Amplifikation durch PCR bestimmt (Kim et al., 1997). Dabei werden die zellulären Proteine (inklusive der Telomerase) isoliert und zusammen mit einem zu den Telomerrepeats komplementären ACX-Primer (welcher gleichzeitig als Forward-Primer für die anschließende PCR fungierte) für 30 min bei 30 °C inkubiert. Direkt im Anschluss erfolgte die Amplifikation der durch die Telomerase verlängerten Nukleinsäuresequenzen im Rahmen einer konventionellen Real-Time PCR, wobei der TS-Primer als Reverse Primer diente. Der gesamte Reaktionszyklus (enzymatische Reaktion und PCR) erfolgte in einem geschlossenen Glaskapillarsystem, welches für die Durchführung der PCR mit Hilfe des LightCycler 3 Instruments (Roche) verwendet wurde.

3.2.7.1 Proteinisolation

Nach Resuspendierung der MNC-Zellpellets in 196 µl TRAPeze 1xChaps Lysis Buffer erfolgte eine Inkubation bei 4 °C für 30 min und eine Zentrifugation bei 4 °C mit 4000 rpm für 20 min. Danach wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert, mit 4 µl RNasin versehen und bis zur Durchführung der Assays bei -20 °C gelagert.

3.2.7.2 Messung der Telomeraseaktivität

Das Lysat von 10.000 mononukleären Zellen wurde standardmäßig mit einem Mastermix aus 10,6 µl PCR-Wasser, 2 µl Primermischung (1 µl TS und 1 µl ACX),

0,4 µl MgCl₂ und 2 µl Fast Start SYBR Green PCR Master Mix pro Probe versetzt. Als Positivkontrolle dienten HEK-Zellen, als Negativkontrolle TRAPeze CHAPS-Lysispuffer. Das Gemisch wurde in Glaskapillaren überführt und anschließend für exakt 30 min bei 30 °C inkubiert. In dieser Zeit erfolgte die Verlängerung des Templates durch die Telomerase. Danach wurden die Kapillaren unverzüglich in den LightCycler überführt. Bei 90 °C für eine Dauer von 10 min wurden Telomerase und DNA denaturiert und gleichzeitig die im Master-Mix enthaltene DNA-Polymerase aktiviert. Im Anschluss erfolgte eine PCR mit 40 Zyklen (jeweils 20 s bei 95 °C, 30 s bei 60 °C und 50 s bei 72 °C). Um eine Vergleichbarkeit der einzelnen Läufe zu gewährleisten und die Qualität der PCR-Reaktion zu prüfen, wurden bei jedem Lauf 1000 HEK293-Zellen als Positivkontrolle mitgemessen, anhand derer im Vorfeld bereits eine Standardkurve von 0–10.000 Zellen erstellt worden war ($R^2 > 0,99$). Darüber hinaus diente eine weitere Standardkurve von 1.000 – 20.000 MNCs als Qualitätskontrolle der MNC-PCR. Diese Standardkurven sind in **Abb. 10** dargestellt.

Als positives Ergebnis für den Nachweis einer Telomeraseaktivität wurde ein über der dreifachen Standardabweichung des Mittelwerts der Negativkontrollen (CHAPS-Puffer) liegendes PCR-Signal definiert. Alle Proben der Studienprobanden waren Telomerase-positiv. Anschließend konnte das Verhältnis zwischen den zu analysierenden Proben und den HEK293 Zellen bestimmt werden. Die Telomeraseaktivität der Proben wurde als Äquivalent von HEK293 Zellen angegeben.

3.2.8 Auswertung

Die angegebenen Daten werden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe von ungepaarten Student-T-Tests für den Vergleich zwischen zwei Gruppen und mit Hilfe einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) mit nachfolgender Korrektur für Mehrfachvergleiche bei mehr als zwei Gruppen (Bonferroni-Korrektur). Dazu wurde die SPSS-Software, Version 16.0, verwendet. Als statistisches Signifikanzniveau wurde $p=0,05$ festgelegt.

4. Ergebnisse

4.1 Charakteristika des Probandenkollektivs

Die Zusammenstellung der vier Probandengruppen erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für Sport- und Präventivmedizin der Universität des Saarlandes, Saarbrücken. Eine erste Selektion geschah durch Fragebögen, mit deren Hilfe chronisch Kranke und Raucher von der Studie ausgeschlossen wurden. Alle anderen Personen wurden internistisch untersucht und einer Fahrradergometrie zur Leistungsdiagnostik unterzogen. Vor der Belastung erfolgte die Blutabnahme in nüchternem Zustand nach schriftlicher Einverständniserklärung. Die Gruppe der jungen Athleten umfasste Mitglieder des Bundesleichtathletikkaders (B- und C-Kader) der Lang- und Mittelstreckenläufer, bei den älteren Athleten handelte es sich überwiegend um Marathonläufer und Triathleten, die über eine dauerhafte sportliche Aktivität seit mehr als 30 Jahren berichteten (sog. „Mastersathleten“). Die Kontrollprobanden wurden passend zu Alter und Geschlecht der Sportler gesucht. Auch sie mussten gesunde Nichtraucher sein. Die Grenze für sportliche Betätigung in der Kontrollgruppe wurde auf maximal eine Stunde wöchentlich festgelegt. Insgesamt wurden 125 potentielle Probanden gescreent. 104 Probanden nahmen schließlich an der Studie teil (**Abb. 5**).

Der Normwert für die durchschnittliche Ergometerleistung beträgt bei einem untrainierten 30-jährigen gesunden Mann 3,0 Watt/kg Körpergewicht. Für Frauen gilt ein Wert von 2,5 W/kg Körpergewicht. Pro weitere Lebensdekade reduziert sich diese Leistungsfähigkeit um 10 Prozent (Siegenthaler W, Klinische Pathophysiologie, Georg Thieme Verlag KG, 2006). Anhand der von uns ergometrisch erhobenen Daten lässt sich demnach sagen, dass die Sportler stark überdurchschnittliche Leistungen (Watt/kg KG) erbrachten und die Kontrollprobanden dem altersgemäßen Durchschnitt entsprachen (junge Athleten $5,2 \pm 0,8$ Watt/kg KG, junge Kontrollen $2,8 \pm 1,0$ Watt/kg KG; ältere Athleten $3,8 \pm 0,7$ Watt/kg KG, ältere Kontrollen $2,2 \pm 0,3$ Watt/kg KG; **Abb.5**).

Charakteristisch für die Athleten waren ein niedrigerer Ruhepuls, tiefere Ruheblutdruck- und BMI-Werte. Zudem wurden die Nüchternblutzuckerkonzentration und das Nüchtern-Lipidprofil gemessen. Das Lipidprofil der Sportler

war deutlich besser als das der Kontrollen. Die Mitglieder der älteren Gruppen, sowohl Athleten als auch Nicht-Sportler, hatten im Mittel verglichen mit ihren jüngeren Vergleichsgruppen höhere Lipidwerte. **Abb. 5** zeigt die Basischarakteristika der einzelnen Gruppen als Mittelwerte \pm Standardabweichung.

4.2 Hochregulation Telomer-regulierender Faktoren

Ein wichtiger Teil zur Stabilisierung der T-Loop-Struktur der Telomere ist der Telomer Repeat-Binding Factor 2 (TRF2), welcher mit anderen Telomer-assoziierten Proteinen interagiert und diesen als Bindungsstelle dient. Außerdem ist er am Erkennen von DNA-Schäden beteiligt (van Steensel et al., 1998; Danial et al., 2004).

In den im peripheren Blut zirkulierenden mononukleären Zellen (MNCs) wurde mittels Westen Blot-Analyse die TRF2-Proteinexpression gemessen. Es fand sich eine Hochregulation von TRF2 zugunsten der jungen (junge Kontrollen $100 \pm 10\%$, jungen Athleten $176 \pm 11\%$, $p < 0,001$) und älteren Athleten (ältere Kontrollen $115 \pm 10\%$, ältere Athleten $175 \pm 10\%$, $p < 0,001$) im Vergleich zu den Kontrollen (**Abb. 6 A**).

Ebenso wurde in der jungen Athletengruppe eine 1,7-fache (junge Kontrollen $100 \pm 9\%$, junge Athleten $172 \pm 11\%$, $p = 0,001$) und in der älteren Athletengruppe eine 2,2-fache (ältere Kontrollen $124 \pm 9\%$, ältere Athleten $219 \pm 11\%$, $p < 0,001$) Hochregulation der TRF2-mRNA beobachtet (**Abb. 6 B**).

Des Weiteren wurden die Auswirkungen von sportlicher Aktivität auf das heterodimere Protein Ku mit seinen Untereinheiten Ku70 und Ku80 untersucht. Dieser Faktor ist ein wesentlicher Bestandteil der DNA-Proteinkinase, welche eine zentrale Rolle in der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen spielt (Suwa et al., 1996). Am Telomer selbst interagiert Ku mit den Telomer Repeat-Binding Factors TRF1 und TRF2 (Shingo et al., 2005; Weipoltshammer et al., 1999). Die Ergebnisse der PCR-Experimente (**Abb. 7**) zeigen die Hochregulation der mRNA-Expression von Ku70 (ältere Kontrollen $94 \pm 12\%$, ältere Athleten $192 \pm 12\%$, $p < 0,001$) und Ku80 (ältere Kontrollen 100 ± 8 , ältere Athleten $171,2 \pm 9\%$, $p < 0,001$) in der Gruppe der älteren Athleten im Vergleich zu den älteren Nichtsportlern. Für

	Junge Kontrollen	Junge Athleten	p	Ältere Kontrollen	Ältere Athleten	p
n	26	32		21	25	
Geschlecht (männlich/weiblich)	15/11	25/7		14/7	19/6	
Alter (Jahre)	21,8 [2,8]	20,4 [3,3]	0,097	50,9 [7,6]	51,1 [7,8]	0,953
Body mass index (kg/m ²)	22,1 [3,3]	20,3 [1,3]	0,010	27,0 [3,6]	22,8 [2,4]	<0,001
Systolischer Blutdruck (mmHg)	125,8 [6,8]	117,6 [10,6]	0,147	135,8 [21,1]	127,5 [17,0]	0,162
Diastolischer Blutdruck (mmHg)	72,5 [9,6]	65,2 [7,5]	0,081	87,5 [7,6]	79,8 [17,7]	0,310
Herzfrequenz (min ⁻¹)	82,8 [5,1]	59,5 [8,9]	< 0,001	78,5 [5,7]	51,8 [6,5]	< 0,001
Trainingsdauer (h/Woche)	0,4 [0,4]	13,9 [4,1]	< 0,001	0,4 [0,49]	9,6 [3,3]	< 0,001
Trainingsdistanz (km/Woche)	-	72,9 [27,1]		-	80,5 [15,7]	* 0,06
Maximale Leistung (W)	206 [83]	340 [56]	< 0,001	203 [44,8]	271 [71]	0,032
Relative maximale Leistung (W/kg)	2,8 [1,1]	5,2 [0,8]	< 0,001	2,2 [0,3]	3,8 [0,7]	< 0,001
Nüchternblutglukose (mg/dl)	89,6 [12,1]	82,5 [11,8]	0,087	90,9 [14,3]	87,5 [10,0]	0,214
Gesamtcholesterin (mg/dl)	188,3 [43,5]	170,4 [28,8]	0,041	225,2 [36,6]	197,2 [29,5]	< 0,001
HDL-Cholesterin (mg/dl)	56,2 [16,4]	64,3 [20,2]	0,138	60,6 [13,7]	65,9 [20,0]	0,185
LDL-Cholesterin (mg/dl)	115,3 [36,2]	87,6 [30,7]	0,005	143,0 [29,4]	108,2 [25,9]	< 0,001
Triglyceride (mg/dl)	112,8 [48,6]	78,8 [27,1]	0,005	140,3 [97,3]	82,9 [39,1]	< 0,001

Abbildung 5

Kenndaten der jungen und älteren Athleten sowie der entsprechenden Kontrollprobanden ohne regelmäßiges Training. Die Darstellung der Daten erfolgt als Mittelwerte mit Standardabweichung. Die Trainingsdistanz konnte bei einer wöchentlichen sportlichen Aktivität von weniger als 1 Stunde in den Kontrollgruppen nicht ermittelt werden. HDL, high-density Lipoprotein und LDL, low-density Lipoprotein. * = Junge im Vergleich zu älteren Athleten

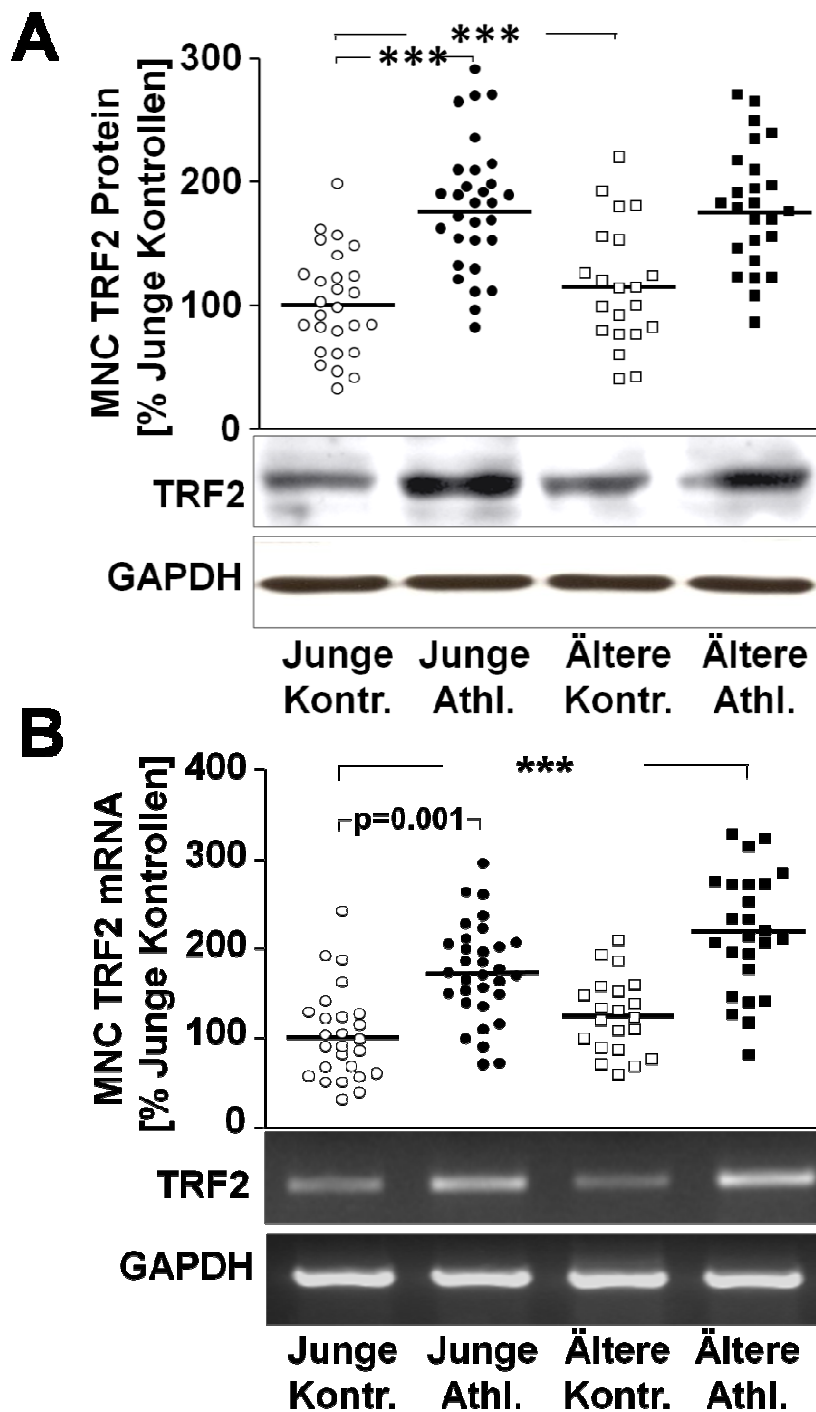


Abbildung 6

Expression des Telomere Repeat-Binding Factor (TRF2) in jungen und älteren Athleten (Athl.) im Vergleich zu entsprechenden Kontrollprobanden (Kontr.) ohne regelmäßiges Training. **(A)** zeigt die Protein- und **(B)** die mRNA-Expression von TRF2 in peripher zirkulierenden mononukleären Zellen (MNC) dargestellt als % der jungen Kontrollen. *** $p < 0,001$ vs. junge Kontrollen

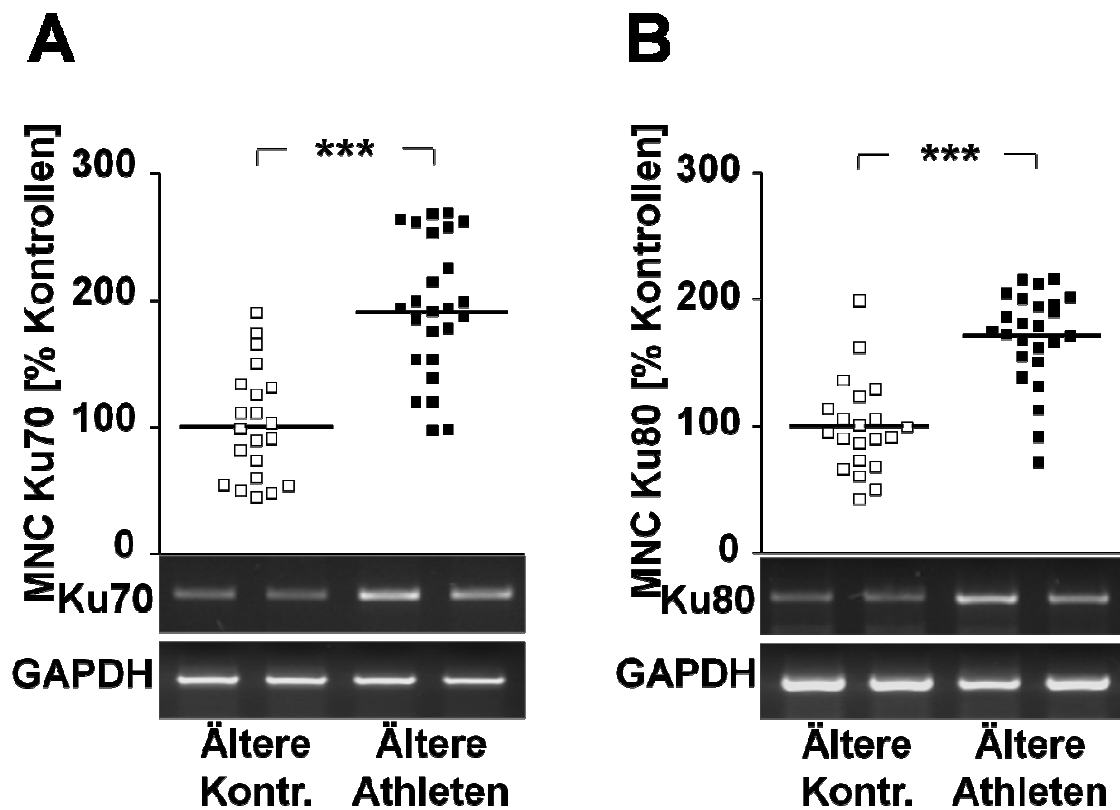


Abbildung 7

Expression der Telomer-assoziierten Proteine Ku70 und Ku80 auf mRNA-Ebene in älteren Athleten im Vergleich zu Kontrollprobanden (Kontr.) ohne regelmäßiges Training. **(A)** zeigt die mRNA-Expression von Ku70 und **(B)** die mRNA-Expression von Ku80 in peripher zirkulierenden MNCs dargestellt als % der älteren Kontrollen. *** $p < 0,001$ im Vergleich zu Kontrollen

die jungen Athleten und ihre Kontrollgruppe zeigte sich kein Unterschied auf mRNA-Ebene.

4.3 Herabregulation der Cell Cycle Checkpoint Kinase 2 (Chk2) und vermehrte Expression der Seneszenz-Marker p16 und p53 bei Nicht-Sportlern

PCRs zeigten eine Herabregulation der Expression der Zellarrest-vermittelnden Chk2 auf mRNA-Ebene in den MNCs der jungen und älteren Sportler auf weniger als die Hälfte im Vergleich zu den Kontrollen (junge Kontrollen $100\pm 11\%$, junge Athleten $43\pm 9\%$, $p=0,007$; ältere Kontrollen $99\pm 14\%$, ältere Athleten $47\pm 12\%$, $p=0,012$) (**Abb. 8**). Interessanterweise gab es nahezu keinen Unterschied in der Expression zwischen den beiden Athletengruppen.

In weiteren Proteinexpressionsanalysen wurden die für die Zellalterung bedeutsamen Proteine p16 und p53 im Hinblick auf eine Regulation durch regelmäßiges Ausdauertraining untersucht. Der Seneszenzmarker p16 wird in seneszenten Zellen stärker exprimiert, in jungen Zellen dagegen geringer. Die funktionelle Konsequenz ist eine Inhibition der Proliferation über einen Zellzyklusarrest und ggf. die Induktion der Apoptose (Krishnamurthy et al., 2006; Kurt et al., 1999). Das wichtigste zelluläre Tumorsuppressorprotein p53 reguliert multiple zelluläre Funktionen. Unter anderem ist es die bedeutendste Kontrollinstanz für Proliferation und Apoptose.

Western Blot Analysen brachten eine deutlich höhere p16-Expression in den MNCs der älteren Kontrollen im Vergleich zu den Sportlern zur Darstellung (ältere Kontrollen $100\pm 10\%$, ältere Athleten $34\pm 9\%$, $p<0,001$) (**Abb. 9**). Das p53-Protein war in der Gruppe der älteren Kontrollen verglichen mit den älteren Athleten ca. 2,1-fach erhöht (ältere Kontrollen $210\pm 12\%$, ältere Athleten $80\pm 8\%$, $p<0,001$) (**Abb. 10**). Zwischen den beiden jungen Probandengruppen zeigte sich kein Unterschied in Bezug auf die p16- und p53-Expression.

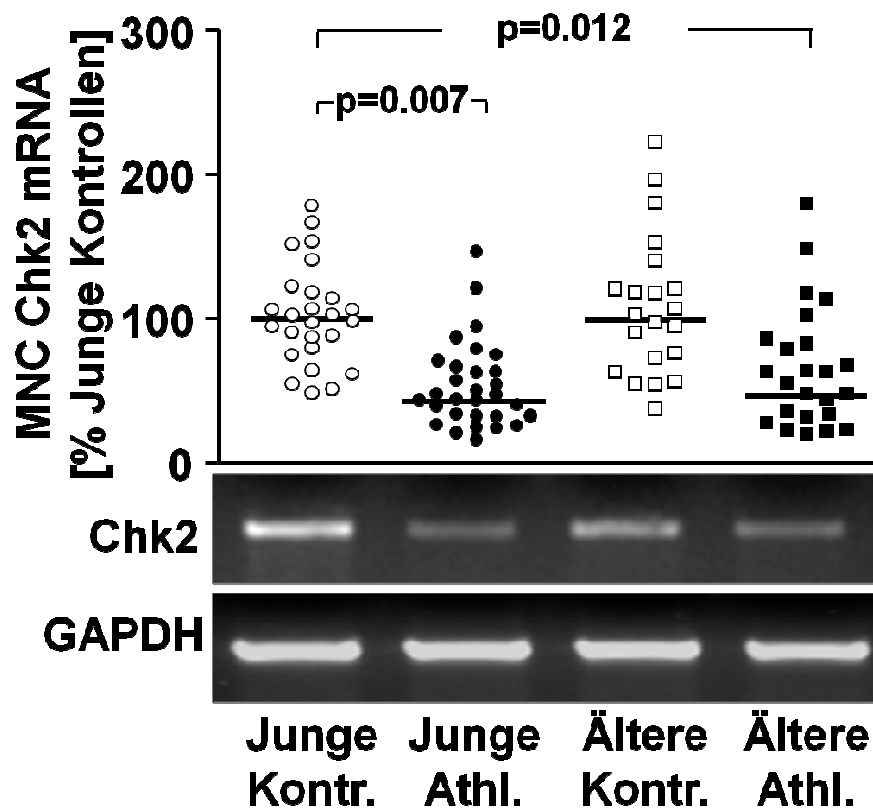


Abbildung 8

mRNA-Expression der Cell Cycle Checkpoint-Kinase 2 (Chk2) in den MNCs junger und älterer Athleten (Athl.) im Vergleich zu entsprechenden Kontrollprobanden (Kontr.) Die Darstellung erfolgt als % der jungen Kontrollen.

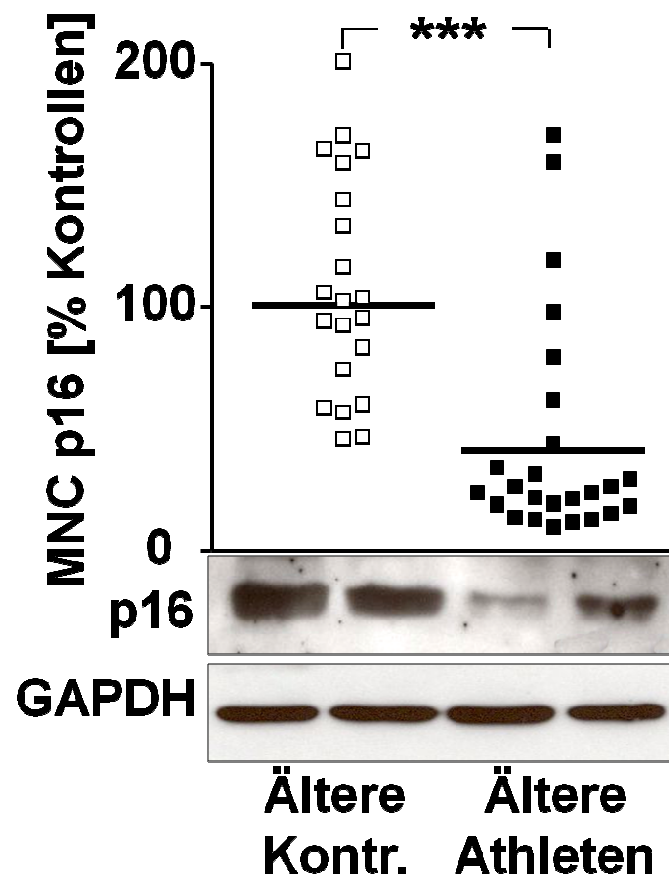


Abbildung 9

Repräsentativer Westen Blot und Quantifizierung der Proteinexpression des Seneszenzproteins p16 in älteren Athleten im Vergleich zu entsprechenden Kontrollprobanden (Kontr.). Die Darstellung erfolgt als % der älteren Kontrollen.

*** $p < 0,001$ im Vergleich zu Kontrollen

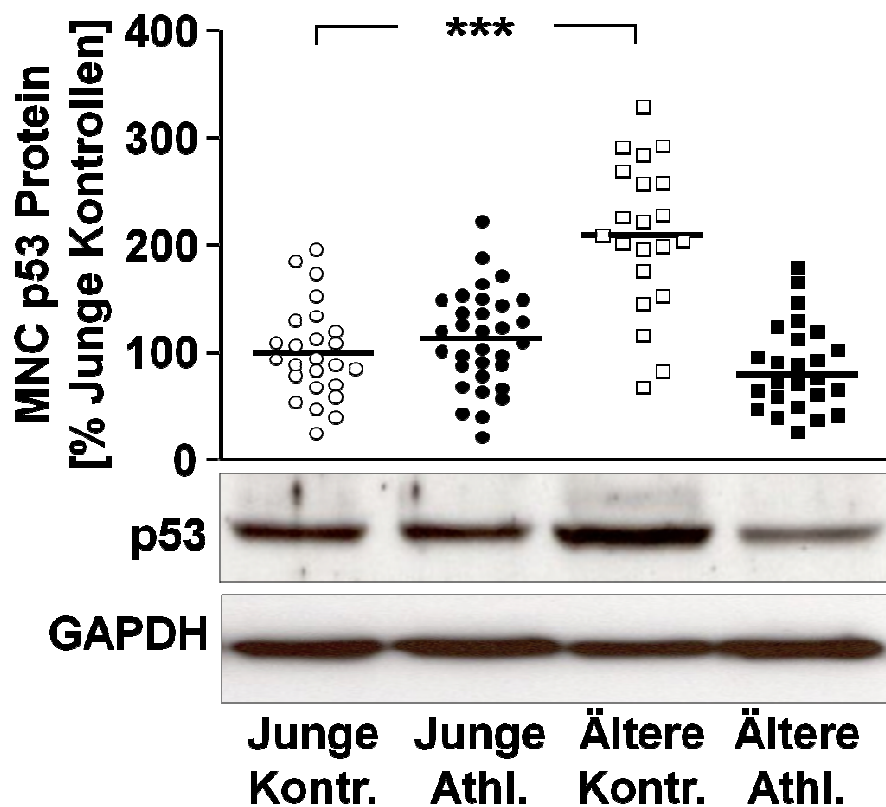


Abbildung 10

Repräsentativer Western Blot und Quantifizierung der Proteinexpression des Apoptose-regulierenden Proteins und Tumorsuppressors p53. Im Vergleich stehen junge und ältere Athleten (Athl.) und ihre jeweilige Kontrollgruppe (Kontr.) Die Darstellung erfolgt als % der jungen Kontrollen. *** $p < 0,001$

4.4 Reduktion des Telomerlängenverlustes in den Mastersathleten

Bei jeder Zellteilung werden die Telomere am Ende der Chromosomen verkürzt, bis die Erosion schließlich so weit vorangeschritten ist, dass die Chromosomen instabil werden und die Zellen in den Zellarrest oder die Apoptose übergehen (Danial et al., 2004). Um herauszufinden, ob regelmäßiges körperliches Ausdauertraining die Telomerverkürzung bei Menschen beeinflusst, wurden zwei unabhängige Messungen der MNC- bzw. Leukozytentelomerlänge durchgeführt, deren Ergebnisse im Folgenden gezeigt sind.

Zunächst wurde eine Flow-FISH-Analyse der kryokonservierten MNCs der vier Probandengruppen durchgeführt (Kap. 3.2.5). Diese Methode lässt eine genaue Differenzierung zwischen Granulozyten und Lymphozyten zu. In **Abb. 11** und **Abb. 12** sind zum einen die Erstellung der Eichkurve (**Abb. 11 A und B**) und zum anderen die Messergebnisse eines repräsentativen älteren Athleten und eines repräsentativen älteren Kontrollprobanden dargestellt (**Abb. 12 A und B**). **Abb. 11 (A)** zeigt leuchtende Mikrobeads einer bestimmten Größe und Fluoreszenzintensität als Streugrafik. Die mittleren Intensitätswerte wurden für jede der 5 Mikrobeadgruppen (M1 – M5) gemessen, und in jedem Lauf wurde das FACS-Gerät so eingestellt, dass vergleichbare Messungen möglich waren. Die Intensität der Bead-Fluoreszenz korreliert mit den Molekülen an löslichem Fluorochrom (Molecules of soluble fluorochrome, MESF, $R^2 > 0,99$). In **Abb. 11 (B)** sind die Negativkontrollen dargestellt, d.h. MNCs mit dem DNA-Farbstoff LDS751, jedoch ohne PNA-Probe, die als Kontrollen in jedem Lauf enthalten waren. Lymphozyten und Granulozyten wurden durch eine schwache FITC-Autofluoreszenz und DNA-Färbung identifiziert. Das Histogramm zeigte eine geringe FL1-Intensität (unter 10 willkürlich gewählten Einheiten). Die FACS Plots in **Abb. 12 (A)** und **(B)** sind exemplarisch für eine repräsentative älteren Kontrollperson und einen repräsentativen älteren Athleten mit dem gemessenen Vorwärts (FSC)- und Seitwärtsstreulicht (SSC)-Plot, Fluoreszenz im FL1- und FL3-Kanal und dem schlussendlichen Histogramm zur Bestimmung der mittleren Fluoreszenzintensität der ausgewählten Zellpopulation. Im Einzelnen wurden die Proben zuerst im FSC- und SSC-Kanal angeleuchtet, durch die Größe (FSC) und Granularität (SSC) der Zellen ließen sich Lymphozyten von Granulozyten

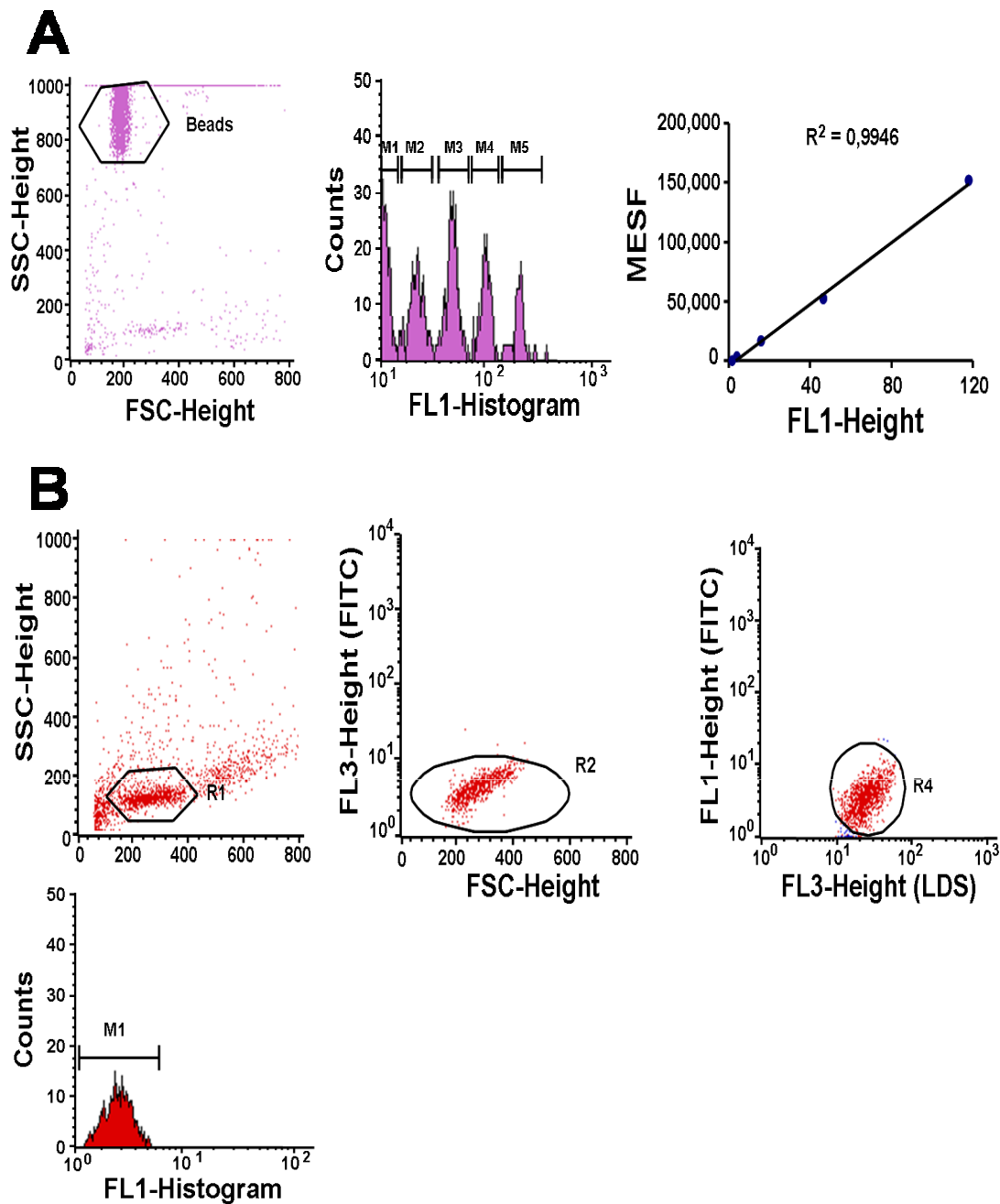


Abbildung 11

Telomerlängenbestimmung mittels Flow-FISH. **(A)** 5 Mikrobeadgruppen von definierter Größe und Fluoreszenzstärke dienen zum Vergleich einzelner Läufe untereinander. Die Fluoreszenzintensität korreliert mit den Molekülen an löslichem Fluorochrom **(B)** Negativkontrollen: MNCs mit DNA Farbstoff LDS751 jedoch ohne PNA –Probe. Diese Proben waren in jedem Lauf enthalten.

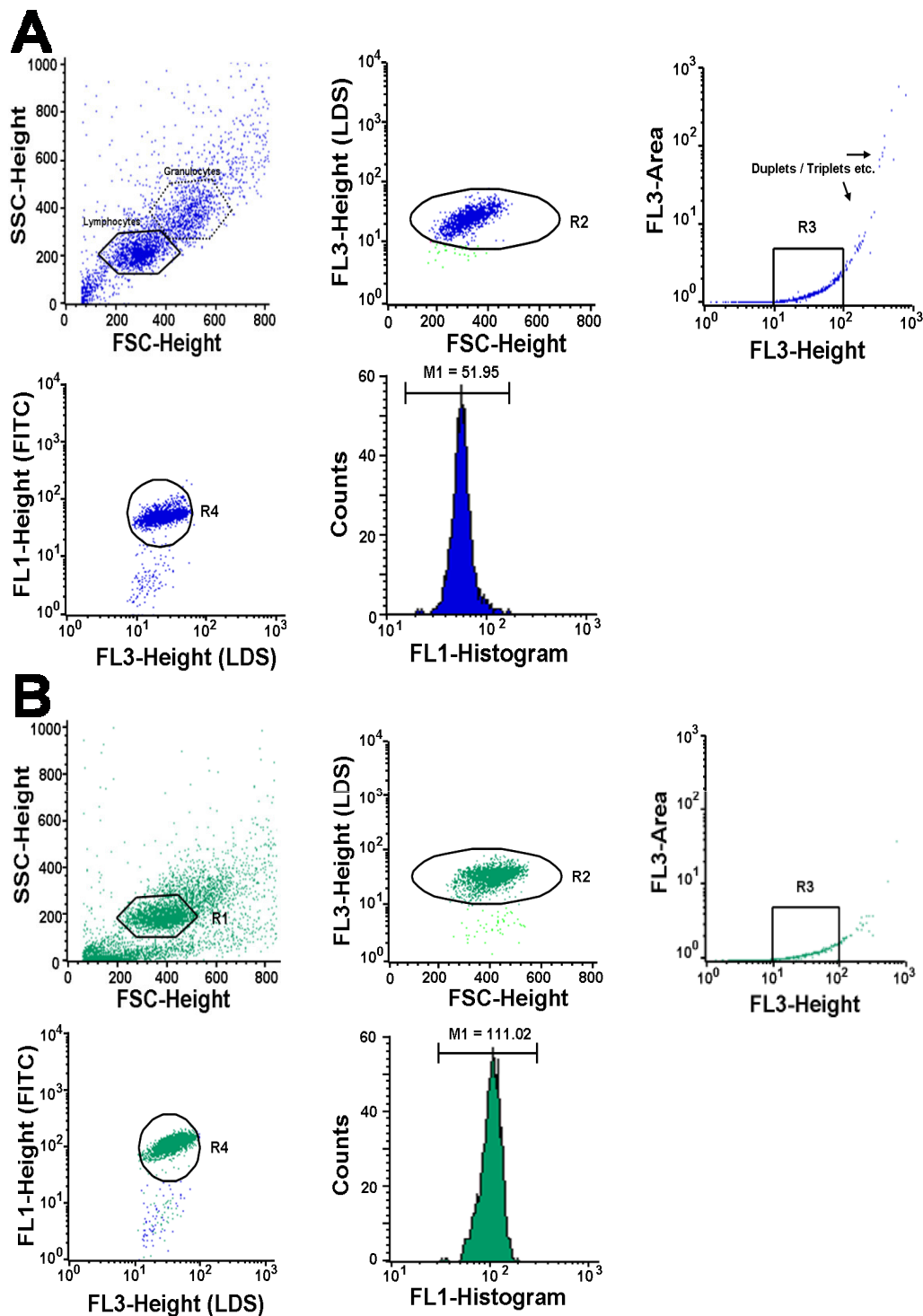


Abbildung 12

Telomerlängenbestimmung mittels Flow-FISH. **(A)** zeigt das Messergebnis eines repräsentativen älteren Kontrollprobanden und **(B)** das eines repräsentativen älteren Athleten in verschiedenen Kanälen (Diagramme 1-4) und die mittlere Fluoreszenzintensität der ausgewählten Zellpopulation (letztes Diagramm)

unterscheiden (R1-Gate). Im Folgenden wurde sichergestellt, dass nur kernhaltige Zellen ausgewählt waren (LDS-Fluoreszenz, Gate R2). Gate R3 schloss solche Areale mit hoher LDS-Fluoreszenz, welche typischerweise durch Zellcluster verursacht werden, aus. Im letzten Gate R4 wurden schließlich LDS751-gefärbte Zellen mit suffizienter PNS-Hybridisation ausgewählt, um letztendlich die mittlere Fluoreszenzintensität der Leukozyten und Granulozyten in der Probe zu messen. Die mittlere Fluoreszenzintensität wurde mit Hilfe einer früheren Standardkurve (Widmann et al., 2007) in die Einheit für Telomerlänge (kbp) umgerechnet.

In der Gruppe der jungen Athleten fand sich kein Unterschied zu der jungen Kontrollgruppe im Bezug auf die Telomerlänge. Die älteren Kontrollpersonen hingegen hatten sowohl in den Lymphozyten als auch in den Granulozyten deutlich kürzere Telomere als alle anderen Probandengruppen. Dieser Verlust war bei den älteren Athleten nicht zu verzeichnen (**Abb. 13 A und B**) (Lymphozyten: junge Kontrollen 8572 ± 293 kbp, junge Athleten 8500 ± 284 kbp, $p=0,86$; ältere Kontrollen 5069 ± 133 kbp, ältere Athleten 8050 ± 285 kbp, $p<0,001$; Granulozyten: junge Kontrollen 9071 ± 315 kbp, junge Athleten 8702 ± 326 kbp, $p=0,42$; ältere Kontrollen 5595 ± 187 kbp, ältere Athleten 8533 ± 303 kbp, $p<0,001$). Eine repräsentative Flow-FISH-Messung eines älteren Athleten und eines älteren nicht-sportlichen Kontrollprobanden zeigt **Abb. 14**.

Als zweite Methode zur Messung der Telomerlänge wurde die Real-Time PCR gewählt (nach Cawthon et al. 2003), bei der die kumulative genomische Menge an Telomersequenzen mit dem Gen 36b4 verglichen wird, das nur in einer einzigen Kopie pro Genom vorhanden ist und daher Single Copy Gene heißt. Diese Messung bestätigte das Ergebnis der Flow-FISH-Assays und zeigte im Wesentlichen ebenfalls eine Reduktion der Telomerlänge in den MNCs der älteren Kontrollprobanden im Vergleich zu allen anderen Probandengruppen. Der Verlust der Leukozytentelomerlänge war wiederum in den älteren Mastersathleten attenuiert (junge Kontrollen $100 \pm 6\%$, junge Athleten $97 \pm 5\%$, $p=0,63$; ältere Kontrollen $73 \pm 4\%$, $p=0,09$, ältere Athleten $86 \pm 6\%$, $p=0,006$). (**Abb. 15**).

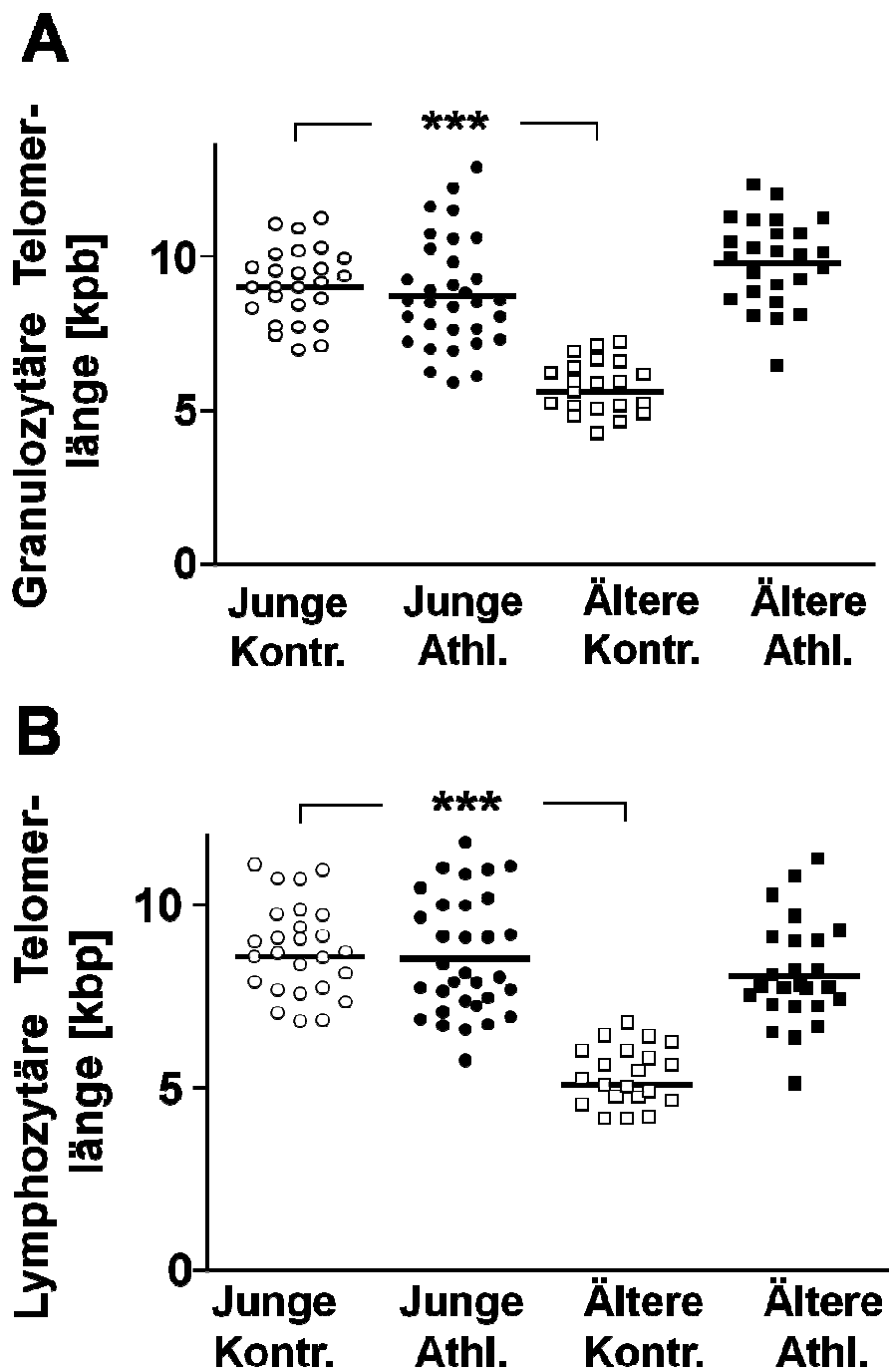


Abbildung 13

Flow-FISH-Analyse der Telomerlänge (Kilobasenpaare, kbp). **(A)** zeigt die Länge der Telomere in Granulozyten und **(B)** die der Lymphozyten. Verglichen werden junge und ältere Athleten (Athl.) mit regelmäßigem Training mit Probanden ohne sportliche Aktivität (Kontr.),

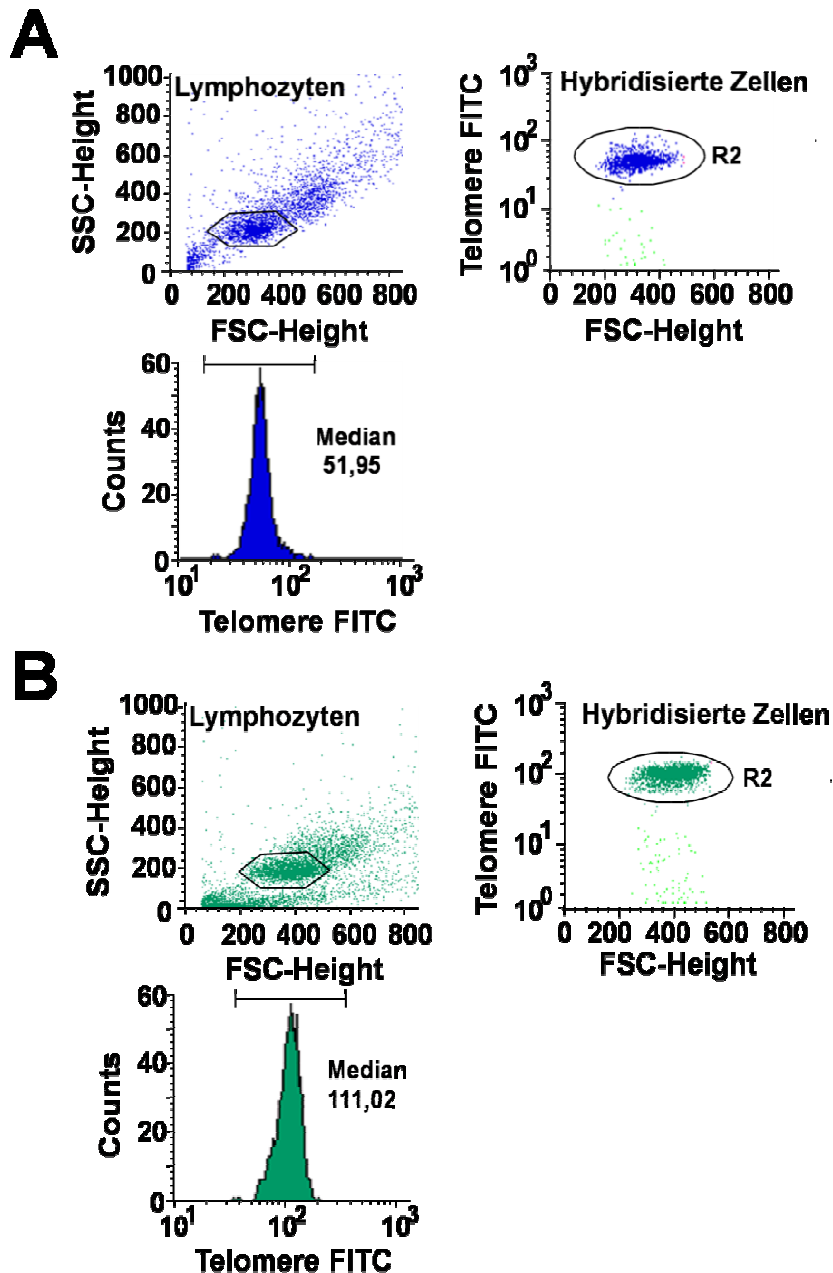


Abbildung 14

Telomerlängenmessung mittels Flow-FISH-Analyse **(A)** zeigt eine repräsentative Analyse eines älteren Kontrollprobanden und **(B)** eines älteren Athleten. Linke Säule: Scatterplot mit Lymphozytengate, mittlere Säule: FSC-markierte Zellen im Vergleich zur Intensität der Telomerfärbung (FITC Kanal), untere Säule: Histogrammanalyse der FITC Intensität der Telomere im Vergleich zur mittleren Intensität. *** $p < 0,001$

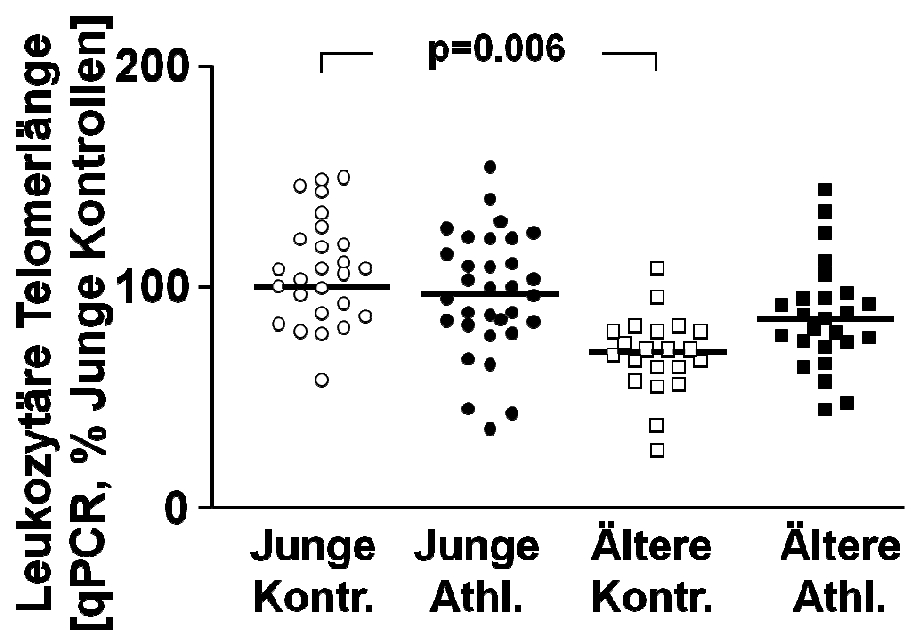


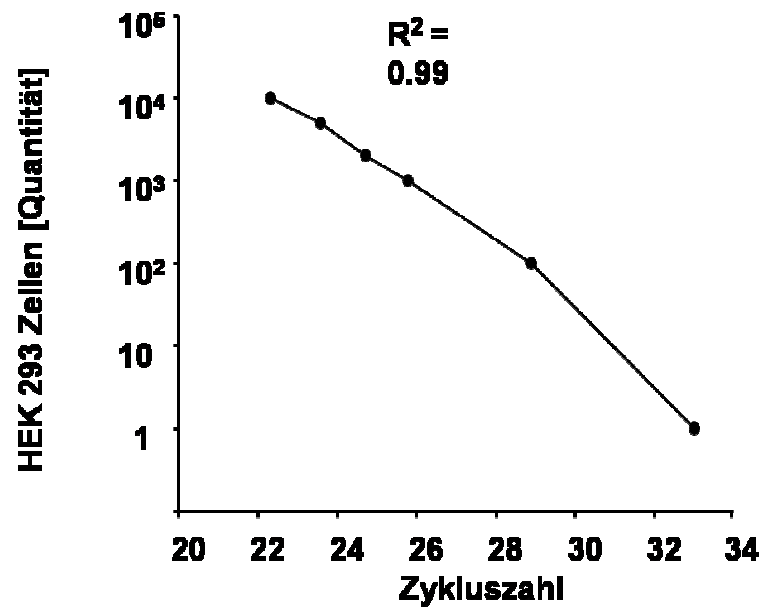
Abbildung 15

Telomerlänge bestimmt durch RT-PCR in mononukleären Zellen (MNC) junger und älterer Athleten (Athl.) im Vergleich zu entsprechenden Kontrollen (Kontr.). Darstellung als % der jungen Kontrollen.

4.5 Gesteigerte MNC-Telomeraseaktivität in jungen und älteren Athleten

Erodierte Telomerstücke können durch die Telomerase in Abhängigkeit von deren Aktivität wieder synthetisiert werden (Richard et al., 1999; Weipoltshammer et al., 1999). Um die Frage zu beantworten, ob regelmäßiges Ausdauertraining mit einer Aktivitätssteigerung der MNC-Telomerase assoziiert ist, wurden Aktivitätsmessungen mittels TRAP-Assays (Kap. 3.2.7) durchgeführt. Dazu wurden zunächst Standardtitrationskurven mit 0-10.000 HEK293-Zellen (Kontrollzellen mit hoher Telomeraseaktivität) und mit humanen MNCs von 1.000-20.000 Zellen erstellt (**Abb. 16**). Daraufhin wurden 10.000 MNCs der Probanden in den Assay eingesetzt (Doppelbestimmung), um die relative Aktivität der Telomerase in den MNCs der einzelnen Personen zu bestimmen. Die Ergebnisse wurden als HEK-Äquivalent ausgedrückt und sind dargestellt als %-Wert verglichen mit der jungen Kontrollgruppe. Die Messungen ergaben, dass es bei den Ausdauersport betreibenden jungen und älteren Athleten zu einer höheren MNC-Telomerase-Enzymaktivität kam (junge Kontrollen $100 \pm 15\%$, junge Athleten $251 \pm 19\%$, $p < 0,001$; ältere Kontrollen $92 \pm 16\%$, ältere Athleten 182 ± 12 , $p = 0,006$) (**Abb. 17**). Zwischen der Telomeraseaktivität der beiden Kontrollgruppen gab es keinen Unterschied.

A – Standardtitrationskurve mit HEK 293 Zellen



B – Standardtitrationskurve mit humanen MNCs

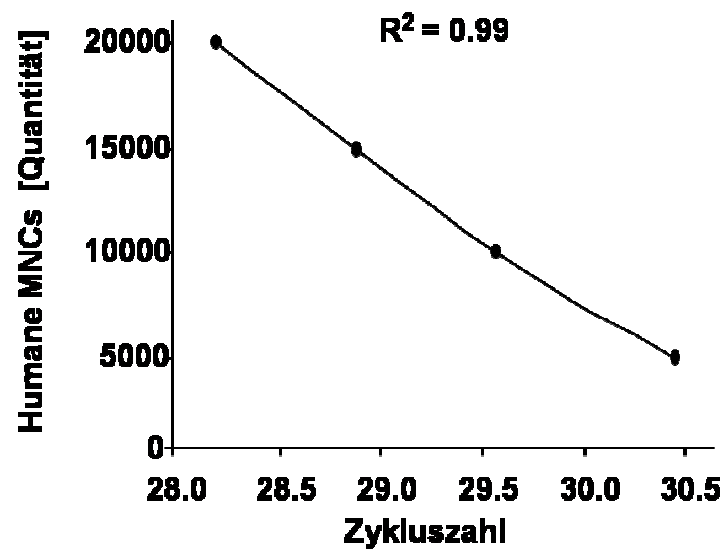


Abbildung 16

Verdünnungsreihen von **(A)** 0-10,000 HEK 293 Zellen und **(B)** 1,000-20,000 humanen MNCs zur Ermittlung der Telomeraseaktivität mittels TRAP-Assay. Die Korrelationskoeffizienten (R^2) waren > 0.99 in allen Experimenten.

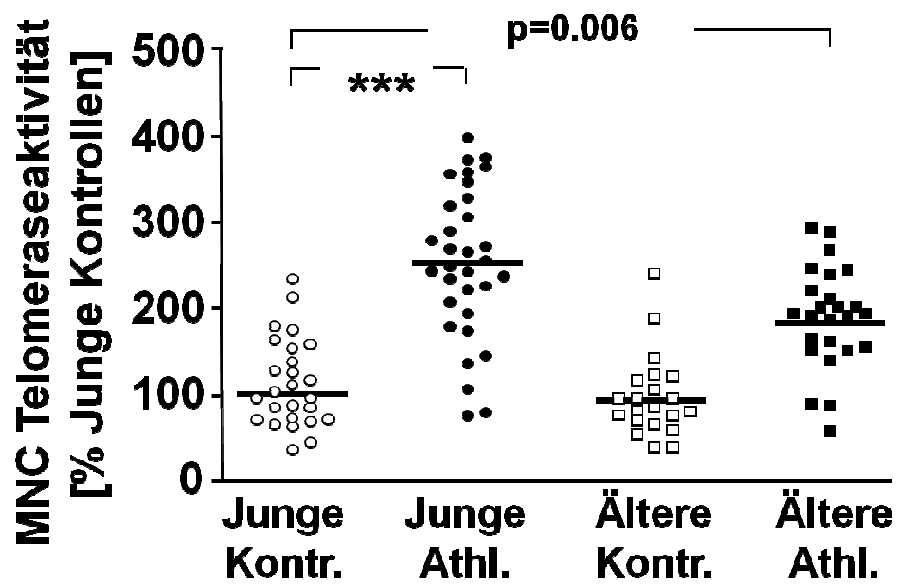


Abbildung 17

Telomeraseaktivität in jungen und älteren Athleten (Athl.) im Vergleich zu entsprechenden Kontrollen (Kontr.). Die Messung erfolgte mittels TRAP-Assay. Die Darstellung erfolgt als % der jungen Kontrollen. *** $p < 0,001$

5. Diskussion

Telomere und die mit ihnen assoziierten Proteine dienen als endständige Strukturen der Chromosomen zum einen der Stabilität und zum anderen dem Schutz der Erbinformation bei jeder Zellteilung (Müller et al., 1938, Blasco et al., 2005, Calado & Young, 2009). In der direkten Vorarbeit zu dieser Studie wurde in Mäusen beobachtet, dass sportliche Aktivität einen positiven Effekt auf die Zellalterung hat (Werner et al., 2008). Die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen und die Bedeutung bei Menschen blieben bisher nur unvollständig verstanden. Daher untersuchten wir den Telomerkomplex und weitere Seneszenz-assoziierte Proteine und verglichen sportlich aktive Menschen zweier Altersgruppen mit entsprechenden Kontrollprobanden ohne sportliche Aktivität.

Die mRNA und Proteinanalysen der zirkulierenden mononukleären Zellen aus dem Blut der Studienteilnehmer zeigten eine mit sportlicher Aktivität assoziierte Hochregulation von Telomer-stabilisierenden Faktoren wie beispielsweise TRF2, Ku70 oder Ku80 und zum anderen eine niedrigere Expression von Zellalterungsmarkern wie z.B. p16 und p53. Diese Veränderungen gingen mit einem attenuierten Telomerlängenverlust bei sportlich aktiven Probanden der älteren Gruppe, sowie mit einer Erhöhung der Telomeraseaktivität aller Sportler einher. Zusammenfassend zeigen sich demnach positive Effekte des körperlichen Trainings auf den Telomerkomplex und auf mit Alterung verbundene Zellproteine.

Diese Studie versucht grundlegende Mechanismen zu identifizieren. Dabei wurde das Probandenkollektiv so gewählt, dass die Intensität körperlicher Betätigung das einzige Unterscheidungsmerkmal der Probanden war. Nicht auszuschließen ist dabei, dass unbekannte Ursachen zu Verzerrungen der Ergebnisse führten. Fahrradergometrisch erhobene Daten zeigten, dass die beiden Sportlergruppen im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollgruppen deutlich höhere Leistungen erbringen konnten. Ebenso positive Auswirkungen ergaben die Erstellung des Lipidprofils und die Auswertung der Ruheherzfrequenzen und –blutdrücke, beides wesentliche Faktoren in der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen.

5.1. Auswirkungen sportlicher Aktivität auf den Telomerkomplex und auf Seneszenz-regulierende Proteine

Da ein Zusammenhang zwischen der Telomerlänge in zirkulierenden mononukleären Zellen (MNCs) und der in aortalen Gefäßzellen besteht (Wilson et al., 2008), lassen sich aus den Ergebnissen dieser Studie Rückschlüsse auf das Herz-Kreislauf-System ziehen. Es wurde die Frage verfolgt, ob regelmäßige sportliche Aktivität positiven Einfluss auf die biologischen Alterungsprozesse in MNCs hat.

Sowohl in der Gruppe der jungen als auch in der der älteren Athleten zeigten Western Blot-Analysen eine Hochregulation der Telomer-assoziierten und Telomer-stabilisierenden Proteine TRF2, Ku70 und Ku80. PCRs brachten zudem eine erhöhte Expression von TRF2 in beiden Sportlergruppen und eine Hochregulation des heterodimeren Protein Ku in den älteren Athleten zur Darstellung.

Eine besondere Rolle kommt dabei dem Telomere Repeat-Binding Factor TRF2 zu, von dem bekannt ist, dass er als Bindungsstelle für andere Telomer-assoziierte Proteine dient und die T-Loop-Struktur stabilisiert. Außerdem ist er an der Signaltransduktion im Rahmen der Kontrolle von DNA-Schäden beteiligt (van Steensel et al., 1998; Danial et al., 2004; Blasco et al., 2005; Fuster et al., 2006). Eine weitere Aufgabe ist bei verminderter Expression die Vermittlung von Apoptose in Kardiomyozyten unter anderem auch unabhängig von der Telomerlänge an sich (Fuster et al., 2006; Spyridopoulos et al., 2004). TRF2 ist demnach wahrscheinlich ein eigenständiger Regulator der Zellalterung und hat protektive Wirkung auf die Telomere (Haendeler et al., 2004; Leri et al., 2003, Artandi et al., 2000).

Das Protein Ku mit seinen Untereinheiten Ku70 und Ku80 ist als Hauptbestandteil der DNA-Proteinkinase wichtig für Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen (Suwa et al., 1996). Am Telomer selbst interagiert Ku mit den Telomere Repeat-Binding Factors TRF1 und TRF2 (Shingo et al., 2005; Weipoltshammer et al., 1999). Eine Hochregulation der Proteine TRF2, Ku70 und Ku80 wie in den beiden Athletengruppen stellt somit einen Schutz der Zellen vor Seneszenz und Apoptose dar.

PCR-Analysen konnten eine erhöhte Expression der Cell Cycle Checkpoint-Kinase 2 (Chk2) in den MNCs der Nicht-Sportler darstellen, welche für die Vermittlung des Zellarrestes in seneszenten Zellen verantwortlich ist (Gire et al., 2004). In Zellen ohne vorangeschrittene Alterung hindert TRF2 die Chk2 daran, ihre Seneszenz-vermittelnden Signalwege zu aktivieren. Eine aktive Chk2 hingegen verhindert das Binden von TRF2 an die DNA, hemmt somit die schützende Funktion und führt die Zelle in den Arrest (Buscemi et al., 2009). Die Ergebnisse bzgl. der gegenläufigen Regulation von TRF2 und Chk2 unserer Probanden entsprechen diesen Beobachtungen.

Zudem zeigten weitere Western Blots neben der Expressionssteigerung der Telomer-stabilisierenden Proteine auch eine Herabregulation Apoptose-vermittelnder Proteine wie p16 und p53 in den Zellen sportlich aktiver Probanden höheren Alters. Zwischen den beiden jungen Untersuchungsgruppen bestand in dieser Beziehung kein Unterschied. Für p53, den „Wächter des Genoms“ und wichtigsten Faktor in der Vermittlung des programmierten Zelltodes, bewiesen Leri et al. 2003 einen Zusammenhang zwischen einer gesteigerten Expression dieses Proteins und der Telomererosion nach Ausschalten der Telomerase, was zu Herzdilatation führte. Im umgekehrten Fall kann eine niedrige Konzentration an p53 die nachteiligen Effekte des Telomerlängenverlustes zu einem gewissen Maße ausgleichen (Chin et al., 1999). P53 steht also in direktem Zusammenhang mit der Telomerlänge. Die Frage, ob nun die verminderte Expression von p53 in den Sportlerzellen die Telomerlänge schützt, oder ob eine verlangsamte Telomerlängenverkürzung die Expression des Proteins verzögert, kann diese Arbeit nicht beantworten.

Ebenso wie p53 war auch p16 in den MNCs der älteren Athleten weniger exprimiert. Die vermehrte Expression von p16 in den Zellen der Nicht-Sportler sprach hingegen für eine vorangeschrittene Seneszenz, da ein hohes Zellalter zur p16-Synthese und folglich zum Zellarrest, ggf. sogar zur Apoptose, führt (Krishnamurthy et al., 2006; Kurt et al., 1999). Darüber hinaus ist p16 mit körperlicher Inaktivität assoziiert (Liu et al., 2009). Ein Zusammenwirken der Telomerase mit ihrer katalytischen Untereinheit TERT und p16 wurde von Veitonmäki et al. 2003 beschrieben. Eine hohe Aktivität der TERT führte hier zu einer Herabregulation von p16, was in einer verzögerten Seneszenz der Zellen resultierte.

Die Aktivität der Telomerase wurde in dieser Studie mit Hilfe des TRAP-Assay ermittelt. Sowohl für die jungen als auch für die älteren Athleten ergaben sich erhöhte Enzymaktivitäten. Die gleichzeitig bestehende und eben beschriebene Herabregulation von p16 korreliert mit dieser Beobachtung. Sowohl von der Telomerase als auch von der TERT wissen wir, dass sie das Wachstum und Überleben von Endothelzellen regulieren und als antiapoptotische Faktoren dienen (Haendeler et al., 2004). Fehlt die Telomerase, welche die Zellen direkt vor dem Zelltod schützt, oder arbeitet sie mit zu geringer Aktivität, resultiert dies in Apoptose (Leri et al., 2003; Blasco et al., 2005; Artandi et al., 2006) und führt zu Hypertonus (Perez-Rivero et al., 2006). In unserem Probandenkollektiv war ein manifester Hypertonus ein Ausschlusskriterium, doch bietet dieses Wissen die Möglichkeit die Rolle der Telomerase bei der Entstehung von Bluthochdruck in einer Patientenstudie zu ermitteln.

Die Hauptaufgabe der Telomerase ist die Substitution von Nukleotiden an die Telomere, die sich während der Mitose verkürzt haben. Die Telomerlänge in den MNCs wurde mittels Flow-FISH-Analyse ermittelt. Dabei zeigten die Zellen der älteren Athleten mit einer sportlichen Aktivität von mehreren Dekaden längere Telomere als ihre Kontrollen. Unter den beiden jungen Probandengruppen gab es keinen Telomerlängenunterschied. Dieses Ergebnis wurde durch die Durchführung von quantitativen Real-Time PCRs bestätigt, welche ebenfalls längere Telomere in den Zellen der älteren Sportler darstellten.

Einen möglichen Grund für die verlangsamte Erosion der Telomere in der Gruppe der älteren Athleten vermuten wir in der gesteigerten Aktivität der Telomerase. Dafür sprechen Ergebnisse aus der Forschungsgruppe um Ornish aus dem Jahr 2008, die eine Steigerung der Telomeraseaktivität durch eine positive Änderung der Lebensführung ermitteln konnte. Unter anderem zeigte sie auch, dass sinkende LDL-Werte mit dem Anstieg der Telomeraseleistung einhergehen. Niedrigere LDL-Werte waren auch im Serum der beiden Sportlergruppen nachweisbar.

Die einzelnen Parameter des Telomerkomplexes von im peripheren Blut zirkulierenden MNCs stehen zudem in enger Relation zur Häufigkeit und zum Ausprägungsgrad kardiovaskulärer Erkrankungen des Menschen. So steigt das Risiko eine Herz-Kreislauf-Erkrankung zu entwickeln mit abnehmender Telomerlänge (Brouillette et al., 2007). Besteht bereits eine koronare

Herzkrankheit, steigt die Wahrscheinlichkeit daran zu versterben mit dem Grad der Telomererosion (Farzaneh-Far et al., 2008, van de Harst, 2010). Eine Telomerlängenverkürzung konnte ebenfalls bei Menschen mit Herzinsuffizienz gezeigt werden (Wong et al., 2008). Das Altern selbst ist somit einer der Hauptrisikofaktoren für die Entwicklung einer kardiovaskulären Erkrankung.

Im Zusammenspiel aller oben beschriebenen Effekte vermuten wir demnach einen Schutz vor kardiovaskulären Ereignissen durch körperliche Aktivität.

Interessanterweise waren die oben beschriebenen Auswirkungen auf die Telomer-assoziierten Proteine in der jungen Athletengruppe bereits nachweisbar, obwohl im Vergleich zu ihrer Kontrollgruppe kein Unterschied in der Telomerlänge bestand. In der Studie von Cherkas et al. waren hingegen kleinste Telomerlängenunterschiede nachweisbar. Hierfür wurden 2401 Zwillinge untersucht, von denen jeweils einer regelmäßig Sport betrieb. Es ist möglich, dass unsere Untersuchungsgruppe zu klein war, um solch feine Unterschiede darstellen zu können, jedoch konnten wir beobachten, dass die Effekte auf die verschiedenen Strukturen im Gesamtkomplex zügiger eintreten als die eigentliche Änderung der Telomerlänge.

Dieser Studie gingen Untersuchungen an Mäusen voran, bei denen bereits nach dreiwöchigem Laufen eine Hochregulation Telomer-stabilisierender Faktoren in der Gefäßwand und in den MNCs durch eine gesteigerte Expression des endothelialen Stickstoffmonoxids nachweisbar waren. Von Stickstoffmonoxid wissen wir, dass eine geringe Konzentration mit progredientem Zellaltern einhergeht (McCarty, 2004). Darüber hinaus zeigten laufende Mäuse sowohl in den Zellen der Gefäßwand, als auch in den MNCs eine deutliche Hochregulation der Telomeraseaktivität mit ihrer katalytischen Untereinheit TERT (Werner et al., 2008). Die Effekte sportlichen Trainings im Menschen bestätigten diese Ergebnisse.

Alle beobachteten Auswirkungen sind kritisch zu betrachten. So waren in einer Studie aus China keine Unterschiede bezüglich der Telomerlänge bei über 65-jährigen erkennbar, in der ebenfalls Sportler mit Nicht-Sportlern verglichen wurden (Woo et al., 2008). Zum selben Ergebnis kam die Arbeitsgruppe von Shin im Jahr

2008. Hier konnte nach 6-monatigem aerobem Training kein Unterschied in der Länge der Telomere bei 16 Frauen mittleren Alters gefunden werden.

Unsere Probandengruppen waren jedoch so gewählt, dass sich die einzelnen Individuen lediglich in der Ausprägung ihrer sportlichen Aktivität unterschieden, um eine Beeinflussung durch andere Faktoren auszuschließen. Von uns dabei nicht erkannte Umstände, die die Telomerlänge beeinflussen, sind dabei nicht auszuschließen.

Dass jedoch moderate sportliche Aktivität unabhängig vom molekularen Mechanismus die Rate an kardiovaskulären Erkrankungen und dadurch die Mortalität senkt, wird auch jüngst bestätigt (Lee, 2010; Savela et al., 2010).

5.3 Ausblick

Zusammenfassend weisen die erhobenen Daten darauf hin, dass Sport eine Möglichkeit darstellt die Erosion der Telomere und somit das biologische Altern zu verlangsamen. Bedingt durch den verlangsamten zellulären Alterungsprozess vermuten wir eine Risikoreduktion kardiovaskulärer Ereignisse, da das Altern der Zellen an sich einer der Hauptgründe der Entwicklung dieser ist.

Wir können nicht sagen, in welchem Maße die sportbedingten positiven Einflüsse auf den Metabolismus, die Herzfrequenz, den Blutdruck oder das Lipidprofil die Telomerbiologie im Vergleich zu körperlicher Aktivität an sich beeinflusst und ob sie dies überhaupt tun, jedoch ist es denkbar, dass regelmäßiges körperliches Training das Herz-Kreislauf-System durch eine erhöhte Stressresistenz schützt.

In unserer Studie verglichen wir Hochleistungssportler mit absoluten Nicht-Sportlern. Um eine Aussage treffen zu können, ob unsere Ergebnisse auch auf Sportler mit einer durchschnittlichen körperlichen Aktivität anwendbar sind, könnte eine weitere Studie mit Probanden aus verschiedenen Breitensportarten angelegt werden oder eine, in der z.B. Ausdauersportler mit Kraftsportlern verglichen werden. Hierbei könnten dann auch die Fragen verfolgt werden, nach welcher Zeit und Intensität sich erste Änderungen im Telomerkomplex einstellen und ob eine bereits vorangeschrittene Erosion durch das Neueinsetzen sportlicher Aktivität ebenfalls verlangsamt werden kann.

Die Studienergebnisse können außerdem dazu dienen den genauen molekularen Mechanismus weiter zu erforschen. Weitere Studien müssen zeigen, ob und in wie weit die hier beschriebenen Auswirkungen als biologische Marker für präventive Effekte dienen können und ob sich durch weitere Untersuchungen an bereits herzkranken Patienten sogar neue therapeutische Möglichkeiten erschließen lassen.

6. Literaturverzeichnis

1. Artandi SE, DePinho RA. Mice without telomerase: what can they teach us about human cancer? *Nat Med.* 2000;6:852-855.
2. Blasco MA. Telomeres and human disease: Ageing, cancer and beyond. *Nature Reviews Genetics.* 2005;6(8):611-622.
3. Brouillette SW, Moore JS, McMahon AD, Thompson JR, Ford I, Shepherd J, Packard CJ, Samani NJ. Telomere length, risk of coronary heart disease and statin treatment in the West of Scotland Primary Prevention Study: a nested case-control study. *Lancet.* 2007;369:107-114.
4. Buscemi G, Zannini L, Fontanella E, Lecis D, Lisanti S, Delia D. The shelterin protein TRF2 inhibits Chk2 activity at telomeres in the absence of DNA damage. *Curr. Biol.* 2009;19(10):874-9.
5. Calado RT, Young NS. Telomere diseases. *N Engl J Med.* 2009;361(24):2353-65
6. Cawthon RM, Smith KR, O'Brien E, Sivatchenko A, Kerber RA. Association between telomere length in blood and mortality in people aged 60 years or older. *Lancet.* 2003;361:393-395.
7. Chehab NH, Malikzay A, Appel M, Halazonetis TD. Chk2/hCds1 functions as a DNA damage checkpoint in G(1) by stabilizing p53. *Genes Dev.* 2000;14(3):278-88.
8. Cherkas LF, Hunkin JL, Kato BS, Richards JB, Gardner JP, Surdulescu GL, Kimura M, Lu X, Spector TD, Aviv A. The association between physical activity in leisure time and leukocyte telomere length. *Arch Intern Med.* 2008;168(2):154-8.
9. Chin L, Artandi SE, Shen Q, Tam A, Lee SL, Gottlieb GJ, Greider CW, DePinho RA. P53 deficiency rescues the adverse effects of telomere loss and cooperates with telomere dysfunction to accelerate carcinogenesis. *Cell.* 1999;97:527-538.
10. Court R, Chapman L, Fairall L, Rhodes D. How the human telomeric proteins TRF1 and TRF2 recognize telomeric DNA: a view from high-resolution crystal structures. *EMBO Rep.* 2005;6(1):39-45.
11. Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell.* 2004;116:205-219

12. Egholm M, Buchardt O, Christensen L, Behrens C, Freier SM, Driver DA, Berg H, Kim SK, Norden B, Nielsen PE. PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogen-bonding rules. *Nature*. 1993;365:566-568.
13. Farzaneh-Far R, Cawthon RM, Na B, Browner WS, Schiller NB, Whooley MA. Prognostic value of leukocyte telomere length in patients with stable coronary disease: data from the Heart and Soul Study. *Arterioscler Thromb Vas Biol*. 2008;28:1379-1384.
14. Ferbeyre G, Lowe SW. Aging: The price of tumour suppression? *Nature*. 2002;415: 26-27
15. Fuster JJ, Andres V. Telomere biology and cardiovascular disease. *Circ Res*. 2006;99:1167-1180.
16. Gire V, Roux P, Wynford-Thomas D, Brondello JM, Dulic V. DNA damage checkpoint kinase Chk2 triggers replicative senescence. *The EMBO Journal* 2004;23:2554-2563.
17. Greider CW, Blackburn EH. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell*. 1985;43(2 Pt. 1): 405–413
18. Haendeler J, Hoffmann J, Diehl JF, Vasa M, Spyridopoulos I, Zeither AM, Dimmeler S. Antioxidants inhibit nuclear export of telomerase reverse transcriptase and delay replicative senescence of endothelial cells. *Circ Res*. 2004;94:768-775.
19. Hambrecht R, Wolf A, Gielen S, Linke A, Hofer J, Erbs S, Schoene N, Schuler G. Effect of exercise on coronary endothelial function in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2000;342(7):454-460.
20. Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res*. 1961;25:585-621.
21. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, Shay JW. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*. 1994; 266(5193):2011-5.
22. Kim NW, Wu F. Advances in quantification and characterization of telomerase activity by the telomeric repeat amplification protocol (TRAP). *Nucleic Acids Res*. 1997;25(13):2595-7.

23. Krishnamurthy J, Ramsey MR, Ligon KL, Torrice C, Koh A, Bonner-Weir S, Sharpless NE. p16^{INK4a} induces an age-dependent decline in islet regenerative potential. *Nature*. 2006;443:453-457.
24. Kurt W. Kohn B . Molecular Interaction Map of the Mammalian Cell Cycle control and DNA Repair Systems. *Molecular Biology of the Cell*. 1999;10:2703-2734.
25. Laufs U, Werner N, Link A, Endres M, Wassmann S, Jürgens K, Miche E, Böhm M, Nickenig G. Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis. *Circulation*. 2004;109:220-226.
26. Lee IM. Physical activity and cardiac protection. *Curr Sports Med Rep*. 2010;9(4):214-9.
27. Leri A, Franco S, Zacheo A, Barlucchi L, Chimenti S, Limana F, Nadal-Ginard B, Kajstura J, Anversa P, Blasco MA. Ablation of telomerase and telomere loss leads to cardiac dilatation and heart failure associated with p53 upregulation. *EMBO J*. 2003;22:131-139.
28. Liu Y, Sanoff HK, Cho H, Burd CE, Torrice C, Ibrahim JG, Thomas NE, Sharpless NE. Expression of p16(INK4a) in peripheral blood T-cells is a biomarker of human aging. *Aging Cell*. 2009;8(4):439–48.
29. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193(1):265-75.
30. Manson JE, Greenland P, LaCroix AZ, Stefanick ML, Mouton CP, Oberman A, Perri MG, Sheps DS, Pettinger MB, Siscovick DS. Walking compared with vigorous exercise for the prevention of cardiovascular events in women. *N Engl J Med*. 2002;347(10):716-725.
31. McCarty MF. Optimizing endothelial nitric oxide activity may slow endothelial aging. *Med Hypotheses*. 2004; 63:719-723.
32. Müller HJ. The remaking of chromosomes. *The Collecting Net*. 1938;13: 181-198.
33. O'Rourke MF, Hashimoto J. Mechanical factors in arterial aging: a clinical perspective. *J Am Coll Cardiol*. 2007;50:1-13.
34. Ornish D, Lin J, Daubenmier J, Weidner G, Epel E, Kemp C, Magbanua MJ, Marlin R, Yglecias L, Carroll PR, Blackburn EH. Increased telomerase

- activity and comprehensive lifestyle changes: a pilot study. *Lancet Oncol.* 2008;9:1048-1057.
35. Perez-Rivero G, Ruiz-Torres MP, Rivas-Elena JV, Jerkic M, Diez-Marques ML, Lopez-Novoa JM, Blasco MA, Rodriguez-Puyol D. Mice deficient in telomerase activity develop hypertension because of an excess of endothelin production. *Circulation.* 2006;114: 309-317.
 36. Richard J. Hodes. Telomere Length, Aging, and Somatic Cell Turnover. *Journal of Experimental Medicine.* 1999;190: 153-156.
 37. Rufer N, Dragowska W, Thornbury G, Roosnek E, Lansdorp PM. Telomere length dynamics in human lymphocyte subpopulations measured by flow cytometry. *Nat Biotechnol.* 1998;16:743-747.
 38. Savela S, Koistinen P, Tilvis RS, Strandberg AY, Pitkälä KH, Salomaa VV, Miettinen TA, Strandberg TE. Leisure-time physical activity, cardiovascular risk factors and mortality during a 34-year follow-up in men. *Eur J Epidemiol.* 2010
 39. Shin YA, Lee JH, Song W, Jun TW. Exercise training improves the antioxidant enzyme activity with no changes of telomere length. *Mech Ageing Dev.* 2008;219:254-260.
 40. Shingo H, Aritaka N, Yoshifumi N. Comparison between TRF2 and TRF1 of their telomeric DNA-bound structures and DNA-binding activities. *Protein science.* 2005;14:119-130.
 41. Siegenthaler W, Blum HE (2006) Klinische Pathophysiologie. 9. völlig neu bearbeitete Auflage 2006, Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, S. 633
 42. Snell PG, Mitchell JH. Physical inactivity: an easily modified risk factor? *Circulation.* 1999;100(1):2-4.
 43. Solch JP, Arnold GJ. Multiplex reverse transcription polymerase chain reaction combined with temperature gradient gel electrophoresis as a tool for the normalized quantitation of intrinsic factor mRNA. *Electrophoresis.* 1996;17:30-39.
 44. Spyridopoulos I, Haendeler J, Urbich C, Brummendorf TH, Oh H, Schneider MD, Zeiher AM, Dimmeler S. Statins enhance migratory capacity by upregulation of the telomere repeat-binding factor TRF2 in endothelial cells. *Circulation.* 2004;110: 3136-3142.

45. Statistisches Bundesamt Deutschland, 2010, <http://www.destatis.de/bevoelkerungspyramide/>, Stand: 14.08.2010
46. Stewart KJ. Exercise training and the cardiovascular consequences of type 2 diabetes and hypertension: plausible mechanisms for improving cardiovascular health. *JAMA*. 2002;288(13):1622-1631.
47. Suwa A, Hirakata M, Takeda Y, Okano Y, Mimori T and Inada S. Autoantibodies to DNA-dependent protein kinase. Probes for the catalytic subunit. *Journal of Clinical Investigation*. 1996;15:1417–1421.
48. Tunstall-Pedoe H, Kuulasmaa K, Amouyel P, Arveiler D, Rajakangas AM, Pajak A. Myocardial infarction and coronary deaths in the World Health Organization MONICA Project. Registration procedures, event rates, and case-fatality rates in 38 populations from 21 countries in four continents. *Circulation*. 1994;90(1):583-612.
49. Van de Harst P, de Boer RA, Samani NJ, Wong LS, Huizen J, Codd V, Hillege HL, Voors AA, van Gilst WH, Jaarsma T, van Veldhuisen DJ. Telomere length and outcome in heart failure. *Ann Med*. 2010;42(1):36-44.
50. Van Steensel B, Smogorzewska A, de Lange T. TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell*. 1998;92(3):401-413.
51. Veitonmäki N, Fuxe J, Hultdin M, Roos G, Pettersson RF, Cao Y. immortalization of bovine capillary endothelial cells by hTERT alone involves inactivation of endogenous p16INK4A/pRb. *FASEB J*. 2003; 21:337-344.
52. Weipoltshammer K, Schöfer C, Almeder M, Philimonenko VV, Frei K, Wachtler F, Hozák P. Intranuclear Anchoring of Repetitive DNA Sequences, Centromeres, Telomeres, and Ribosomal DNA. *J Cell Biol*. 1999;147(7):1409-18.
53. Werner C, Hanhoun M, Widmann T, Kazakov A, Semenov A, Pöss J, Bauersachs J, Thun T, Pfreundschuh M, Müller P, Haendeler J, Böhm M, Laufs U. Effects of physical exercise on myocardial telomere-regulating proteins, survival pathways and apoptosis. *J Am Coll Cardiol*. 2008;52:470-482.
54. Widmann TA, Herrmann M, Taha N, König J, Pfreundschuh M. Short telomeres in aggressive non-Hodgkin's lymphoma as a risk factor in lymphomagenesis. *Exp Hematol*. 2007;35(6):939-46.

55. Wilson WR, Herbert KE, Mistry Y, Stevens SE, Patel HR, Hastings RA, Thompson MM, Williams B. Blood leucocyte telomere DNA content predicts vascular DNA content in humans with and without vascular disease. *Eur Heart J*. 2008;29:2689-2694.
56. Wong LS, de Boer RA, Samani NJ, van Veldhuisen DJ, van der Harst P. Telomere biology in heart failure. *Eur J Heart Fail*. 2008;10:1049-1056.
57. Woo J, Tang N, Leung J. No association between physical activity and telomere length in an elderly Chinese population 65 years and older. *Arch Intern Med*. 2008;168:2163-2164.

7. Danksagung und Publikation

7.1 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt zum einen Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Laufs für die freundliche Überlassung des Themas und die Möglichkeit mich wissenschaftlich in seiner Arbeitsgruppe zu betätigen. Zum anderen möchte ich mich bei meinem Betreuer Herrn Dr. med. Christian Werner bedanken, der mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand und mich hervorragend in allen Abschnitten der Studie unterstützte. Darüber hinaus waren es seine stets freundschaftliche Art und die unerschöpfliche Motivation, die das Umsetzen gemeinsamer Ideen ermöglicht haben.

Bedanken möchte ich mich ebenso bei Herrn Prof. Dr. med. Michael Böhm für die Möglichkeit, die Dissertation im Labor der Klinik III für Innere Medizin der Universität des Saarlandes erstellen zu können.

Ein Dank auch an alle medizinisch-technischen Assistentinnen, Doktoranden, Ärzte und wissenschaftliche Mitarbeiter für die ständige Hilfsbereitschaft, das freundschaftliche Miteinander, die schöne Zeit und den Spaß, den ich im Rahmen der Forschungsarbeit nie vermissen musste.

Weiterer Dank gilt den Mitarbeitern des Institutes für Sport- und Präventivmedizin der Universität des Saarlandes bei der Einarbeitung in die Methodik der Ergometrie und der tatkräftigen Unterstützung bei der Probandensuche.

Zuletzt ein Dank an meine Familie und Freunde, die mir außerhalb des Labors die nötige Unterstützung boten.

7.2. Publikation

Mit Hilfe der Ergebnisse dieser Arbeit ist folgende **Publikation** entstanden:

Werner C, Fürster T, Widmann T, Pöss J, Roggia C, Hanhoun M, Scharhag J, Büchner N, Meyer T, Kindermann W, Haendeler J, Böhm M, Laufs U. Physical exercise prevents cellular senescence in circulating leukocytes and in the vessel wall. *Circulation*. 2009;120(24):2438-47.

Folgende **Abstracts** wurden auf nationalen und internationalen Kongressen vorgestellt:

Werner C, Fürster T, Roggia C, Scharhag J, Böhm M, Laufs U (2009) Effekte von Ausdauertraining auf Telomerlänge und Seneszenz zirkulierender mononukleärer Zellen von Sportlern gegenüber Nicht-Sportlern verschiedenen Alters. Clin Res Cardiol 98-Suppl 1, April 2009: V836

Werner C, Fürster T, Widmann T, Roggia C, Scharhag J, Böhm M, Laufs U. Effects of endurance training on telomere length and senescence of circulating cells in professional athletes and matched controls without physical exercise. European Heart Journal (2009) 30 (Abstract Supplement), 853.

Werner C, Fürster T, Roggia C, Scharhag J, Böhm M, Laufs U. Abstract 1380: Beneficial Effects of Long-term Endurance Exercise on Leukocyte Telomere Biology. *Circulation* 2009;120:S492

Werner C, Fürster T, Böhm M, Laufs U. Long-term endurance exercise reduces senescence markers and telomere attrition in circulating leukocytes in professional athletes. 61. Mosbacher Kolloquium. The biology of aging – Mechanisms and Intervention. Poster O1, DOI 10.3288/contoo.paper.709.

Werner C, Fürster T, Scharhag J, Böhm M, Laufs U (2010) Long-term Endurance Exercise Attenuates the Aging Process in Circulating Leukocytes. 78th European Atherosclerosis Society Congress, Poster 4.46.